Die Atmungsaktivität isolierter Mitochondrien und die Phospholipidzusammensetzung ihrer Membranen (Vergleichende Untersuchungen bei Oenotheren bekannter genetischer Konstitution)

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

REINER BENZ

aus Giengen/Brenz

1979

Die Atmungsaktivität isolierter Mitochondrien und die Phospholipidzusammensetzung ihrer Membranen (Vergleichende Untersuchungen bei Oenotheren bekannter genetischer Konstitution)

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

REINER BENZ

aus Giengen/Brenz

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung	29.11.1979
Dekan	Prof. Dr. W. Seyffert
1. Berichterstatter	Prof. Dr. B. Schwemmle
2. Berichterstatter	Prof. Dr. A. Hager

INHALT

		Seite
0.	Abkürzungen	0
1.	EINLEITUNG	1
2.	METHODIK	5
2.1.	Versuchspflanzen	5
2.2.	Anzucht der Pflanzen	5
2.3.	Züchtung der Gewebekulturen aus Antheren	6
2.4.	Mitochondrienisolierung	7
2.4.1.	Isolierung der Mitochondrien aus grünen Blättern von Oenothera	7
2.4.2.	Isolierung der Mitochondrien aus Kallusgewebe	10
2.5.	Abtrennung der äusseren Mitochondrienmembran	11
2.6.	Bestimmung der Atmungsaktivität isolierter Mitochondrien mit Hilfe der Clark-Sauerstoffelektrode	12
2.6.1.	Messvorgang	12
2.6.3.	Bestimmung des P/O-Quotienten	12
2.7.	Aktivitätsbestimmung mitochondrialer Enzyme	12
2.7.1.	Succinat-Dehydrogenase	13
2.7.2.	Malat-Dehydrogenase	13
2.7.3.	NADH-Oxidase	13
2.7.4.	Cytochrom-c-Oxidase	14
2.7.5.	Succinat-Cytochrom-c-Reduktase	14
2.7.6.	NADH-Cytochrom-c-Reduktase	14
2.7.7.	Berechnung der Enzymaktivitäten	15
2.8.	Bestimmung des Proteingehalts der Mitochondriensuspension	15
2.9.	Lipidextraktion	16
2.10.	Reinigung, Auftrennung und quantitative Bestimmung der Phospholipide	16
2.10.1.	Eindimensionale Dünnschichtchromatographie zur Reinigung der Phospholipide	16
2.10.2.	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie zur Auftrennung der individuellen Phospholipidklassen	17
2.10.3.	Nachweisreagenzien zur Identifizierung der Phospholipide	17
2.10.3.1.	Nachweisreagenz bei anschliessender Phosphatbestimmung	17

		Seite
2.10.3.2.	Nachweisreagenz bei anschliessender Fettsäuren-Analyse	18
2.10.4.	Quantitative Bestimmung der Phospholipide	18
2.11.	Fettsäuren-Analyse	19
2.11.1.	Methylierung der Fettsäuren	19
2.11.2.	Bestimmung der Fettsäuren-Zusammensetzung	19
2.12.	Elektronenmikroskopie	20
2.13.	Statistik	21
3.	ERGEBNISSE TEIL 1: METHODISCHE VORAUSSETZUNGEN	22
3.1.	Zur Reinigung der Mitochondrienfraktion aus grünen Blättern mit Hilfe eines isopyknischen Ludox-Gradienten	22
3.2.	Eichkurve zur Proteinbestimmung	26
3.3.	Eichkurve zur Phosphatbestimmung	27
3.4.	Eichkurvenschar zur Identifizierung der Fettsäuren	28
4.	ERGEBNISSE TEIL 2 : DER EINFLUSS DES CYTOPLASMONS AUF DIE ATMUNGSAKTIVITÄT ISOLIERTER MITOCHONDRIEN	30
4.1.	Charakterisierung und Vergleich der Atmungsraten der Mitochondrien-Rohfraktionen	31
4.2.	Charakterisierung und Vergleich der Atmungsraten gereinigter Mitochondriensuspensionen	36
4.3.	Charakterisierung der Atmungsraten der Kallus-Mitochondrien	40
4.4.	Vergleich der spezifischen Aktivitäten einiger mitochondrialer Enzyme des Bastardpaars lv	42
5.	ERGEBNISSE TEIL 3 : DIE LIPIDZUSAMMENSETZUNG DER MITOCHONDRIEN UND IHRER MEMBRANEN	43
5.1.	Analyse der Phospholipide	44
5.2.	Vergleich der beiden Mitochondrientypen hinsichtlich ihrer Phospholipid-Zusammensetzung	47
5.3.	Die Phospholipid-Zusammensetzung der äusseren und inneren Membranen bei odorata- und berteriana-Mitochondrien	49
5.4.	Analyse der Fettsäuren	53

		Seite
5.5.	Vergleich der Fettsäuren-Zusammensetzung der mitochondrialen Phospholipide	54
5.6.	Fettsäurenmuster der beiden Mitochondrientypen bzw. der äusseren und inneren Membranen	56
6.	DISKUSSION	59
6.1.	Membranmodelle und Mitochondrienmembranen	60
6.2.	Proteine der inneren Membran	62
6.3.	Lipidstruktur und Protein-Lipid-Assoziationen	67
7.	ZUSAMMENFASSUNG	70
8.	LITERATURVERZEICHNIS	72-79

0. ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bert.	berteriana
CL	Cardiolipin
DD	Dauerdunkel
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FMN	Flavinmononucleotid
FS	Fettsäuren
LL	Dauerlicht
Mit.	Mitochondrien
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
mt	mitochondrial(e)
NADH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
od.	odorata
Oe.	Oenothera
Pi	anorganisches Phosphat
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidyläthanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
PI	Phosphatidylinosit
PS	Phosphatidylserin
RCI	respiratory control index (indices)
tRNA	transfer Ribonucleinsäure

1. EINLEITUNG

Schon bald nach der Wiederentdeckung der Mendelschen Regeln durch De Vries, Correns und Tschermark um 1900 veröffentlichten CORRENS (1909) und BAUR (1909) fast gleichzeitig Ergebnisse von Kreuzungsversuchen bei verschiedenen Pflanzenarten, die der Mendelschen Theorie widersprachen. Deshalb postulierten sie eine Vererbung, die unabhängig vom Zellkern an das Cytoplasma gebunden ist.

Durch zahlreiche Kreuzungsversuche, z.B. durch van WISSELINGH (1920), RENNER (1934), Übersichten bei HAGEMANN (1964) und JINKS (1967), wurde diese Hypothese weiter differenziert: Neben einer allgemein ans Cytoplasma gebundenen Vererbung konnte eine Chloroplastenvererbung nachgewiesen werden. Dies führte zur heute noch gültigen Definition: Dem Genom (Gesamtheit aller Kerngene) wird das Plasmon, die Gesamtheit aller ausserkaryotischen Erbträger, gegenübergestellt, das sich wiederum aus dem Plastom (Gesamtheit aller plastidalen Gene) und dem Cytoplasmon (Gesamtheit aller cytoplasmatischen Gene) zusammensetzt (vgl. MICHAELIS,1962, SCHWEMMLE, B., 1962).

Trotz der epochalen Entdeckung von AVERY et al. (1944), welche die DNA als Träger der Erbinformation zweifelsfrei nachwiesen, und dem damit verbundenen "zentralen Dogma" der Molekulargenetik, war die biochemische Natur der extrachromosomalen Gene lange Zeit umstritten: Denn obwohl schon 1871 von Miescher entdeckt, konnte die DNA nur im Zellkern nachgewiesen werden. Erst nachdem CHUN et al. (1963) sowie SAGER und ISHIDA (1963) DNA aus Chloroplasten und LUCK und REICH (1964) DNA aus Mitochondrien isolieren konnten, war auch die molekulargenetische Grundlage der extrachromosomalen Vererbung gesichert.

Obwohl es in jüngster Zeit Anzeichen dafür gibt, dass auch Centriolen, Basalgranula und Kinetoplasten verschwindend geringe Mengen an DNA enthalten könnten, kann die klassische Definition der extrachromosomalen Vererbung heute molekularbiologisch folgendermassen präzisiert werden (vgl. BOSCHETTI, 1978):

Plastom : Gesamtheit der Chloroplasten DNA
Cytoplasmon : Gesamtheit der mitochondrialen DNA
Beide bilden zusammen das Plasmon : Gesamtheit der ausserkaryotischen DNA.
Dieses wird dem Genom : Gesamtheit der Kern-DNA gegenübergestellt.

Um den Einfluss des Plasmons, dem z.B. SMITH (1977) eine entscheidende Rolle bei der Organisation der eukaryontischen Zelle zumisst, über die rein morphologischen Phänome hinaus erforschen zu können, wurden neben den klassischen Kreuzungsversuchen in zunehmendem Masse biochemische Experimente mit Plastommutanten durchgeführt, die mit einer Häufigkeit von 0,3% bei Chloroplastengenen spontan auftreten (BOSCHETTI, 1978). Heute stehen vor allem die Versuche bei atmungsdefekten Mutanten der Hefe im Vordergrund. So konnte gezeigt werden, dass unter anderem die Cytochrom-Oxidase, die NADH-Cytochrom-c-Reduktase, die Succinat-Dehydrogenase und die mt-ATPase von der mt-DNA zumindest teilweise mitcodiert werden (s. Einzelaufsätze in BÜCHER et al. 1976, GILLHAM 1978 und Übersichtartikel von SAGER 1972, LINNANE et al. 1972, MICHAELIS 1976, SCHATZ 1976).
Da aber die Hefen phylogenetisch sehr einfach organisiert sind, die induzierten Defektmutationen eine z.T. unphysiologische Schädigung darstellen und die Hefen nur fakultativ aerob Energie gewinnen, dürfen die erzielten Ergebnisse nicht ohne erhebliche Vorbehalte auf Organismen höherer Organisationsstufen übertragen werden.

Durch die cytogenetische Sonderstellung der Oenothera ist es möglich, den extrachromosomalen Einfluss mit biochemischen Methoden auch bei einer höheren Pflanze zu untersuchen:
Die haploiden Chromosomensätze bleiben bei den Oenotheren zu Komplexen verbunden, die sich lichtmikroskopisch voneinander unterscheiden lassen. Die Komplexe der Oenothera berteriana[x] werden mit B und l, die Komplexe der Oenothera odorata[x] mit l und v bezeichnet. In der Meiose werden die Chromosomen daher nur komplexweise rekombiniert, wobei auf Grund von Letalfaktoren fast nie Homozygotie auftritt. Durch reziproke Kreuzungen und wegen der uniparentalen (maternalen) Vererbung des Plasmons konnten Bastarde gewonnen werden, die bei gleichem Genom die Plastiden und Mitochondrien der einen resp. der anderen Elternform besitzen (SCHWEMMLE,J. et al. 1938, HAGEMANN 1964). Durch Selbstung lassen sich diese als erbkonstante reine Linien gleicher genetischer Konstitution weiterziehen (CLELAND, 1972).

[x]Nach der systematischen Bearbeitung der Gattung Oenothera, Sektion Oenothera (Onagraceae) von DIETRICH (1977), sind die Oe.bert. als Oe. villaricae und die Oe.od. als Oe.picensis sspe. picensis einzuordnen.

Der konstante und gerichtete Einfluss des extrachromosomalen Erbguts dieser Oenotheren auf zahlreiche physiologische Prozesse konnte inzwischen nachgewiesen werden: So sind z.B. die photoperiodische Blühreaktion (SCHWEMMLE, B., 1962), die circadian Rhythmik der Blattbewegung (FREY und SCHWEMMLE, 1967), die phytochromabhängige L-Phenylalanin-Ammoniumlyase-Aktivität und ihre Beziehung zur Anthocyansynthese (HACHTEL, 1972, HACHTEL und SCHWEMMLE, 1972) und die phytochrominduzierte Flavonoidsynthese (CHRISTNER, 1973) plasmonabhängig.

Diese Versuche beweisen zwar einerseits, dass der Ort der Merkmalsausbildung durchaus unabhängig vom Ort der Erbträger (Chloroplasten und Mitochondrien) sein kann; zum anderen muss bei den erzielten Ergebnissen immer das Zusammenwirken von Genom, Plastom und Cytoplasmon berücksichtigt werden, so dass nur ein indirekter Einfluss gezeigt werden konnte.

Das Ziel dieser Arbeit ist es nun, intakte Mitochondrien aus Blättern der reziproken Oenotheren-Bastardformen lv zu isolieren, die bei gleichem Genom die Mitochondrien der einen bzw. der anderen Elternart aufweisen. Durch vergleichende Untersuchungen bei isolierten Mitochondrien des odorata bzw. berteriana Typs soll der direkte Einfluss des Cytoplasmons auf die Atmungsaktivität nachgewiesen werden; zumal alle bisher bekannten, von der mt-DNA mitcodierten Proteine der Enzymausstattung der Mitochondrien selbst angehören (Übersichtsartikel von SCHATZ, 1976).

In weiteren Versuchen wird die Phospholipid-Zusammensetzung der isolierten Mitochondrien und ihrer Membranen untersucht. Da DOUCE et al. 1972 berichten, dass pflanzliche Mitochondrien ebenso wie tierische zwar nicht die wichtigsten Phospholipide Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin selbst synthetisieren können, wohl aber andere wie Phosphatidsäure, Phosphatidylglycerin und Cardiolipin de novo aufbauen können, während COBON et al. (1974 und 1977) sogar nachweisen konnten, dass Hefemitochondrien bezüglich ihrer Phospholipid-Komponenten praktisch autonom sind, müsste sich der gerichtete Einfluss der mt-DNA auf die Phospholipid-Zusammensetzung bemerkbar machen.

Obwohl anzunehmen ist, dass der überwiegende Anteil der Fettsäuren im Cytosol am Lynenkomplex synthetisiert wird, kennt man auch eine Fettsäuresynthese in den Mitochondrien (KARLSON, 1977). Weil zudem jedoch die Veresterung der Fettsäuren zu Phospholipiden, wie oben erwähnt, zumindest teilweise in den Mitochondrien abläuft, werden auch die Fettsäurenmuster der beiden Mitochondrientypen verglichen.

Die weiteren Versuche zur Phospholipid- und Fettsäuren-Zusammensetzung der äusseren und inneren Membranen leiten sich aus der Sonderstellung der Mitochondrien in der Zelle ab: Diese sind in der Lage, eine unabhängige Proteinbiosynthese durchzuführen, d.h. sie verfügen über einen eigenen genetischen Apparat, bestehend aus mt-DNA, ribosomenähnlichen 70 S-RNA-Partikeln, spezifischer tRNA, mRNA und Polymerasen. Da dieses System eine bakterienähnliche Antibiotika-Empfindlichkeit aufweist und Mitochondrien sich nicht de novo sondern durch Teilung vermehren, wie LUCK (1963) durch radioaktiv markiertes Cholin zeigen konnte, wurde die schon seit der Jahrhundertwende existierende Endosymbiontentheorie neu belebt (Übersicht bei SCHWEMMLER, 1977). Auch Sequenzvergleiche analoger Ferredoxine aus Mitochondrien mit solchen von rezenten Prokaryonten (SCHWARTZ und DAYHOFF, 1978) sind nur mit der Endosymbiontentheorie vereinbar.

Die Endosymbiontentheorie geht davon aus, dass das Mitochondrium als atmendes Bakterium durch eine Endocytose aufgenommen wurde, so dass die äussere Mitochondrien-Membran dem ursprünglichen Plasmalemma der Wirtszelle entspricht.
Da die zu untersuchenden Mitochondrien aber aus genomgleichen Oenotheren isoliert werden, die sich lediglich in ihrer Plasmonausstattung unterscheiden, müssten die äusseren Membranen in etwa gleichen Phospholipidaufbau zeigen, während sich Differenzen nur in der Zusammensetzung der inneren Membranen ergeben sollten, was wiederum in Einklang mit den bisher bei Hefe gefundenen Ergebnissen stünde.

2. METHODIK

2.1. Versuchspflanzen

Versuchsobjekte waren einerseits acht Wochen alte Bastardpflanzen, die aus Kreuzungen zwischen der Oenothera berteriana und der Oenothera odorata entstanden sind und seitdem durch Selbstung weitergezüchtet werden. Die Samen stammen aus Nachzuchten des Jahres 1971.

Labor-Nr.	Bezeichnung	Chromosomenkomplexe	Plasmon
1	B.l bert.Pl. (Oe berteriana)	B und l	berteriana [x]
11	l.v bert.Pl.	l und v	berteriana
12	l.v od. Pl.	l und v	odorata

Tab.: 1 Genetische Konstitution der untersuchten Oenotheren. Mit den Buchstaben B, l, v und I werden die haploiden Chromosomenkomplexe der Versuchspflanzen bezeichnet.

Andererseits wurden aus reifen Antheren der Oenothera berteriana (Freilandpflanze) Kalluskulturen mit der Zielsetzung angelegt, nicht ausdifferenziertes, homogenes und weitgehend chloroplastenfreies Pflanzengewebe zu erhalten, das sich für die Isolierung von Mitochondrien möglichst gleicher Grösse und Gestalt als besonders vorteilhaft erweist. (Bemerkenswerter Weise konnte bis zum Abschluss der Arbeit nur von derElternform Oenothera berteriana Kallusgewebe in beliebigem Umfang erfolgreich kultiviert werden, während die Kalluszüchtung der Oenothera odorata oder von Bastarden erhebliche Schwierigkeiten bereitete.)

2.2. Anzucht der Pflanzen

Die Samen werden in Petrischalen auf zwei Lagen Filterpapier Gelbband (Ø 9 cm, Schleicher und Schüll) ausgelegt, mit Aqua bidest befeuchtet und anschliessend die Petrischalen mit Parafilm luftdicht abgeschlossen. Nach einwöchiger Lagerung in der Klimakammer (22°C, LL) werden die Keimlinge pikiert. Die Anzucht erfolgt bei 20-22°C, 70% relativer Luftfeuchte und Licht-Dunkel-Wechsel(Licht von 4^{00} - 20^{00} Uhr)

[x] Die Elternform Oenothera berteriana war lediglich Ausgangspflanze der Kalluskulturen.

2.3. Züchtung der Gewebekulturen aus Antheren

Die Knospen von Freilandpflanzen der Oenothera berteriana werden zuerst 5 min in 95%igem Alkohol und dann 7 min in 10%iger Natriumhypochlorid-Lösung oberflächensterilisiert. Anschliessend werden sie 3mal mit autoklaviertem Aqua bidest gespült. Danach werden die Antheren aus den Knospen entnommen und in Plastikpetrischalen (Ø 6 cm) auf Agar mit dem Medium Ao (NITSCH und NITSCH, 1969) ausgelegt. Die Petrischalen werden mit Parafilm dicht verschlossen und in die Klimakammer bei 24 $\pm$ 3°C und 10 h Weisslicht (Osram Fluora 40W) eingestellt (ALFERMANN, 1973).

Nach Ausbildung eines ungefähr haselnussgrossen Gewebekallus (nach etwa 4 - 6 Wochen) wurde dieser auf das Agarmedium A_6 in 300 ml Weithals-Erlenmeyerkolben mit Mull-Wattestopfen umgesetzt. Durch Teilung und 3-wöchentliches Umsetzen konnte der Gewebekallus beliebig vermehrt und kultiviert werden.

Agarmedium Ao:

Substanz	Konzentration (in mg/l)
KNO_3	950
NH_4NO_3	720
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	185
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	220
KH_2PO_4	68
$MnSO_4 \cdot H_2O$	11.2
H_3BO_4	10
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
Fe-EDTA	40
Glycin	2
Nicotinsäure	5
Pyridoxinhydrochlorid	0.5
Thiaminhydrochlorid	0.5

Substanz	Konzentration (in mg/l)
Biotin	0,05
Folsäure	0,5
meso-Inosit	100
Difco-Bacto-Agar	9000
Saccharose	10000

Agarmedium A_6:

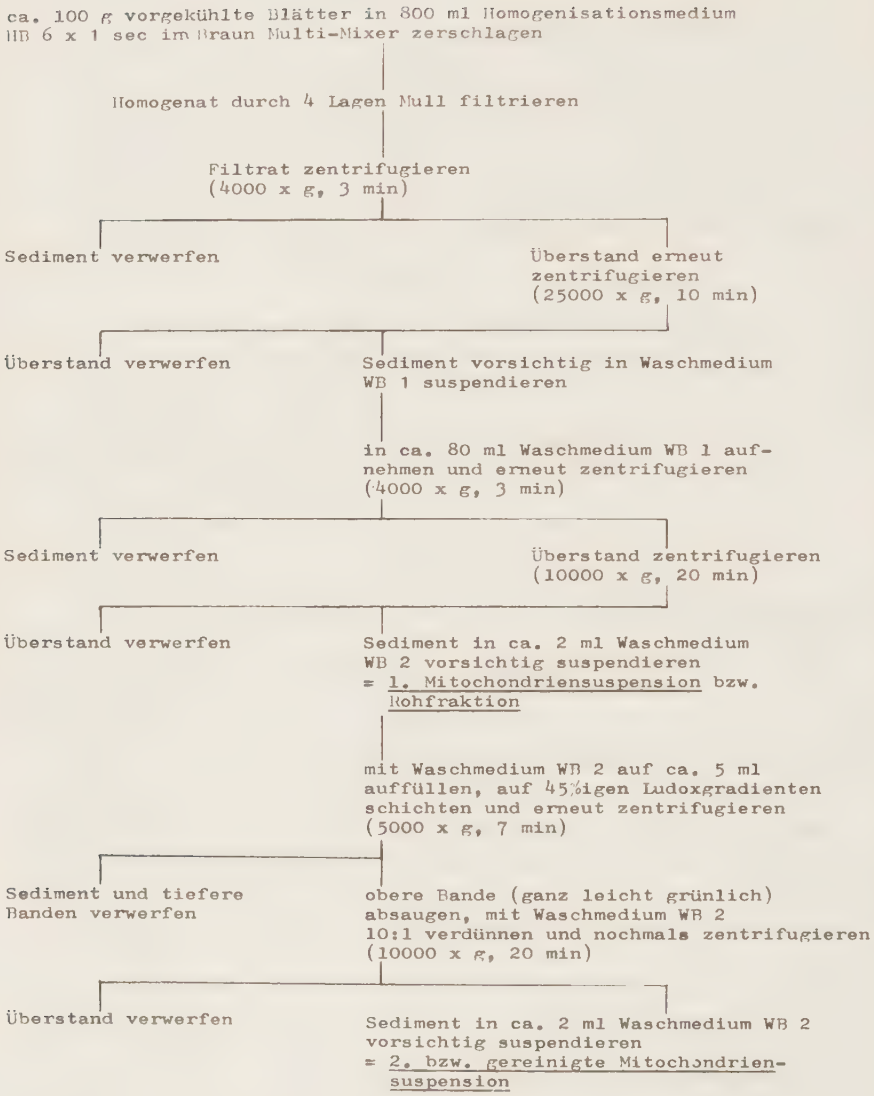
wie Ao + 0,1 mg/l Indolessigsäure
+ 20 g/l Saccharose
+ 5 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
+ 1 mg/l -Chlorphenoxyessigsäure

Tab. 2 : Zusammensetzung der Agarmedien für die Gewebekulturen (nach NITSCH und NITSCH, 1969, verändert).

2.4. Mitochondrienisolierung

2.4.1. Isolierung der Mitochondrien aus grünen Blättern von Oenothera

70 - 80 acht Wochen alte Pflanzen werden 24 h vor Versuchsbeginn im Dauerdunkel (DD) aufbewahrt und zusätzlich die letzten 3 h auf $4^{\circ}C$ abgekühlt.
Danach werden die Blätter gründlich mit Aqua dest gewaschen, von der Mittelrippe befreit und in gekühltem Homogenisationsmedium HB aufgenommen.
Das weitere Vorgehen ist aus dem folgenden Schema ersichtlich:



Alle Arbeiten wurden zwischen 0 und 4°C durchgeführt.

Abb. 1: Flussdiagramm zur Mitochondrienisolierung aus grünen Blättern von Oenothera.

Die Zusammensetzung der verwendeten Medien zeigt Tabelle 3:

Homogenisationsmedium HB

0,3 M Mannit
5 mM EDTA
10 mM KH_2PO_4
5 mM $MgSO_4$
50 mM TES
4 mM Mercaptoäthanol
75 uM Octanol
0,1 % BSA (fettsäurearm)
5 % PEG
pH 7,6 (mit 1 M KOH eingestellt)

Waschmedium WB 1

0,3 M Mannit
5 mM $MgSO_4$
5 mM TES
0,1 % BSA
5 % PEG
Phosphatpuffer pH 7,4 aus 15 mM KH_2PO_4 und 15 mM $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
pH 7,4 (mit 1 M KOH eingestellt)

Waschmedium WB 2

WB 1 ohne 5 % PEG

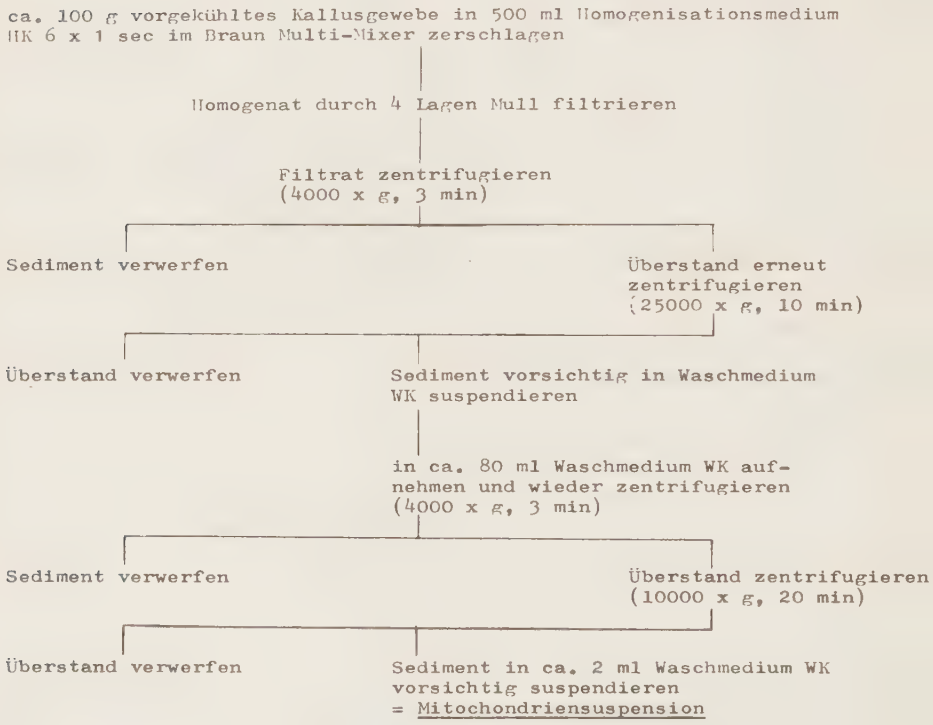
Ludox-Gradient

45 % Ludox HS 40 (Kieselsäuresol der Firma DuPont)
2 % Dextran (MG 60000 - 90000)
50 % doppelt konzentriertes Waschmedium WB 2
pH 7,4 (mit 5 n KH_2PO_4 unter starkem Rühren eingestellt)
mit Aqua bidest auf 100 % auffüllen

Tab. 3: Zusammensetzung der bei der Isolierung von Mitochondrien aus grünen Blättern von Oenothera verwendeten Medien.

2.4.2. Isolierung der Mitochondrien aus Kallusgewebe

Ungefähr 10 Erlenmeyerkolben mit Kallusgewebe (≙ ca. 100 g Gewebe) wurden 3 h vor Versuchsbeginn auf 4°C abgekühlt. Anschliessend wurden die Kalli in 500 ml gekühltem Homogenisationsmedium HK aufgenommen. Das weitere Vorgehen ist aus dem folgenden Fließschema ersichtlich:



Eine weitere Reinigung über einen Ludox-Gradienten brachte keine besseren Ergebnisse.

Alle Arbeiten wurden zwischen 0° und 4°C durchgeführt.

Abb. 2: Flussdiagramm zur Mitochondrienisolierung aus Kallusgewebe.

Die Zusammensetzung der verwendeten Medien zeigt Tabelle 4:

Homogenisationsmedium HK	Waschmedium WK
0,3 M Mannit	0,3 M Mannit
1 mM EDTA	5 mM $MgCl_2$
10 mM KH_2PO_4	5 mM Tris
5 mM $MgCl_2$	0,1 % BSA
4 mM Mercaptoäthanol	Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 nach Sörrensen aus 15 mM KH_2PO_4 und 15 mM $K_2HPO_4.2H_2O$
75 µM Octanol	(pH 7,4 mit 1 n HCl eingestellt)
0,1 % BSA	
25 mM Tris	
pH 7,6 (mit 1 n HCl eingestellt)	

Tab. 4: Zusammensetzung der bei der Isolierung von Mitochondrien aus Kallusgewebe verwendeten Medien.

2.5. Abtrennung der äusseren Mitochondrienmembran

Die Fraktionierung der äusseren Membran wird nach DAY und WISKICH (1975) folgendermassen durchgeführt:

2 ml der gereinigten Mitochondriensuspension mit 2 ml 0,2 %iger Digitonin-Lösung (in Waschmedium WB 2) unter Rühren bei 0°C für 30 min inkubieren

↓

Diese Suspension durch Zugabe von 16 ml Waschmedium WB 2 verdünnen (1:4) und für 30 min bei 30000 x g zentrifugieren

↓

Sediment in ca. 2 ml Waschmedium WB 2 suspendieren = Mitoplastenfraktion (≙ Matrix von innerer Membran umschlossen)

Überstand für 5 h bei 144000 x g zentrifugieren

↓

Überstand verwerfen

Sediment in ca. 1 ml Waschmedium WB 2 suspendieren = Fraktion der äußeren Mitochondrienmembranen

2.6. Bestimmung der Atmungsaktivität isolierter Mitochondrien mit Hilfe der Clark-Sauerstoffelektrode

Die verwendete Clark-Sauerstoffelektrode YSI Modell 53 wird in ein Versuchsgefäss eingesetzt, dass durch einen Umlaufthermostaten auf konstant 27°C gehalten wird.
Bei dieser Temperatur beträgt die Sauerstoffkonzentration von luftgesättigtem Wasser 250 uM (= 100%).

2.6.1. Messvorgang

- 3 ml luftgesättigtes Reaktionsmedium (identisch mit dem Waschmedium WB 2 bzw. WK) in Versuchsgefäss einfüllen
- O_2-Elektrode luftblasenfrei aufsetzen und Temperaturangleich abwarten (ca. 5 min)
- 0,1 - 0,2 ml Mitochondriensuspension mit einer Hamiltonspritze zugeben, Sauerstoff-Abnahme verfolgen ⟶ endogene Atmung (state 1)
- Zugabe von 0,1 ml Substratlösungen (Succinat, Malat, NADH), gesteigerte O_2-Abnahme verfolgen ⟶ Substrat-Atmung (state 4_o)
- Zugabe von 0,1 ml ADP-Lösung, zusätzlich gesteigerte O_2-Abnahme verfolgen ⟶ ADP stimulierte Atmung (state 3)
- Zeitpunkt abwarten, bei dem die Steigung der ursprünglichen Substratatmung erreicht wird, (zugegebenes ADP ist verbraucht) ⟶ state 4_1 : zeigt Kopplung zwischen O_2-Verbrauch und Phosphorylierung an (Berechnung der P/O-Quotienten)
- eventuell erneute Zugabe von ADP
- Zugabe von KCN bzw. Antimycin A, verlangsamten O_2-Verbrauch verfolgen ⟶ Hemmung der Atmungsaktivität

2.6.3. Bestimmung des P/O-Quotienten

Die Bestimmung des P/O-Quotienten als weiteres Mass für die Qualität der Mitochondrienisolierung erfolgt nach ESTABROOK 1967. Wobei das Verhältnis des zugegebenen ADP in nmol zum gemessenen Verbrauch an O_2 (in nAtome O) während der durch ADP stimulierten, gesteigerten Atmungsrate errechnet wird:

$$\frac{P}{O} = \frac{ADP}{O} \quad \frac{\text{nMol appliziertes ADP}}{\text{nAtome verbrauchtes O in state 3}}$$

2.7. Aktivitätsbestimmung einiger mitochondrialer Enzyme

Die Aktivitätsbestimmung der folgenden Enzyme beruht auf der photometrischen Messung der Zu- bzw. Abnahme der Extinktion, (nach DOUCE et al. 1973 und DAY und WISKICH, 1975) die mit einem Schreiber aufgezeichnet wird (Gilford Spectrophotometer 250, Gilford-Schreiber 1100).

2.7.1. Succinat-Dehydrogenase (SDH) E.C. 1.3.99.1

Test-Ansatz:

0,050 ml	800 mM	Succinat-Lösung pH 7,5
0,02 ml	5,3 mM	DCPIP (Dichlorphenolindophenol)
0,1 ml	1 mM	KCN (in Puffer)
1,78 ml	50 mM	Tris-Puffer pH 7,5
0,05 ml		Mitochondriensuspension (Rohfraktion)

Die SDH überträgt den Wasserstoff seines Substrats im Testansatz auf den unphysiologischen Akzeptor DCPIP.
Die Abnahme des oxidierten DCPIP kann bei 600 nm über ca. 3 min linear verfolgt werden (Schreibergeschwindigkeit 2 cm/min).

2.7.2. Malat-Dehydrogenase (MDH), E.C. 1.1.1.40

Test-Ansatz:

0,1 ml	15 mM	Oxalacetat (in Puffer)
0,05 ml	10 mM	NADH (in Puffer)
1,83 ml	50 mM	Tris-Puffer pH 7,5
0,02 ml		Mitochondriensuspension (Rohfraktion)

Messprinzip: Im Testansatz wird NADH durch die MDH nach folgender Reaktion oxidiert:

$$\text{Oxalacetat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{MDH}} \text{L-Malat} + NAD^+$$

Die Aktivitätsbestimmung dieses Enzyms beruht also auf der photometrischen Messung der Konzentrationsabnahme von NADH bei 340 nm (Schreibergeschwindigkeit 2 cm/min).

2.7.3. NADH-Oxidase, E.C. 1.6.99.5

Test-Ansatz:

1,96 ml	50 mM	Tris-Puffer pH 7,5
0,02 ml	10 mM	NADH (in Puffer)
0,02 ml		Mitochondriensuspension (Rohfraktion)

Messprinzip: Gemessen wird die Abnahme des reduzierten NADH anhand der Extinktion bei 340 nm (Schreibergeschwindigkeit 1 cm/min).

2.7.4. Cytochrom-c-Oxidase, E.C. 1.9.3.1

Test-Ansatz:

1,87 ml 50 mM Tris-Puffer pH 7,5
0,1 ml 0,5 mM Cytochrom-c (in Puffer)
0,01 ml 1 mM Na-Dithionit (in Puffer)
0,02 ml Mitochondriensuspension (Rohfraktion)
0,01 ml 0,5 mM $K_3Fe(CN)_6$

1 ml Cytochrom-c-Lösung wird mittels 0,01 ml Na-Dithionit reduziert, und der Überschuss an Reduktionsmittel durch kurzes Durchlüften der heller gewordenen Lösung entfernt. 0,1 ml dieser Lösung werden in Puffer aufgenommen. Die Reaktion wird durch Zugabe der Mitochondriensuspension gestartet, wobei die Konzentrationsabnahme des reduzierten Cytochrom-c bei 550 nm photometrisch gemessen wird. Nach Beendigung des Messvorgangs werden 0,01 ml Eisencyanid hinzugefügt, um die Menge des insgesamt vorhandenen Cytochrom-c zu ermitteln (Schreibergeschwindigkeit 2 cm/min).

2.7.5. Succinat-Cytochrom-c-Reduktase, E.C. 1.3.99.1

Test-Ansatz:

1,80 ml 50 mM Tris-Puffer pH 7,5
0,05 ml 0,5 mM Cytochrom-c (in Puffer)
0,1 ml 1 mM KCN (in Puffer)
0,01 ml Mitochondriensuspension (Rohfraktion)
0,05 ml 10 mM Succinat-Lösung, pH 7,5

Die Aktivitätsbestimmung dieses Enzyms beruht auf der optischen Messung der Zunahme an reduziertem Cytochrom-c bei 550 nm, wobei die zur Reduktion notwendigen Wasserstoffatome vom Substrat Succinat geliefert werden. Diese Reaktion wird durch die Succinat-abhängige Cytochrom-c-Reduktase katalysiert (Schreibergeschwindigkeit 2 cm/min).

2.7.6. NADH-Cytochrom-c-Reduktase, E.C. 1.6.2

Test-Ansatz:

wie 2.7.5. jedoch wird die Reaktion mit einer 10 mM NADH-Lösung gestartet, statt der 10 mM Succinat-Lösung.
Messprinzip wie 2.7.5. doch dient NADH als Wasserstoff-Donator.

2.7.7. Berechnung der Enzymaktivitäten

Aus den erhaltenen Schreiberdiagrammen wird über den Tangens der anfänglichen linearen Extinktionsänderung dE/dt die Enzymaktivität in mU/ml nach der von der Firma BOEHRINGER Biochemica 1971 veröffentlichten Methode errechnet:

$$\frac{mU}{ml} = \tan\alpha \cdot \frac{a.1000.V}{b.\varepsilon\ d.v}$$

Dabei bedeuten:

- a = Papiervorschub in cm/min
- V = eingesetztes Gesamtvolumen
- b = Papierbreite
- d = Schichtdicke der Lösung in der Küvette in cm
- v = eingesetztes Volumen (hier: Mitochondriensuspension)
- ε = mikromolarer Extinktionskoeffizient in $cm^2/\mu Mol$, für Cytochrom-c = 18,5 NADH = 6,3, DCPIP = 20

Die so bestimmte Enzymaktivität wird anschliessend auf den Proteingehalt der Mitochondriensuspension bezogen: Diese spezifische Aktivität erhält die Dimension mU/mg Protein bzw. nMol umgesetztes Substrat x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$.

2.8. Bestimmung des Proteingehalts der Mitochondriensuspension

Die Proteinbestimmung erfolgt nach HEIL und ZILLIG 1970, wobei die Proteine durch Amidoschwarz blau angefärbt werden. Durch optische Messung bei 630 nm kann die Konzentration dieses Farbkomplexes bestimmt werden, dessen Extinktion dem Proteingehalt der Lösung proportional ist. Zugleich ist diese Methode relativ empfindlich ($\geqslant$ C,25 ug Protein).

5 ul einer Proteinlösung werden auf Cellulose-Acetat-Streifen aufgetragen. Nach der Antrocknung werden diese Streifen in ein Färbebad für 10 min getaucht (0,5 g Amidoschwarz, 45 ml Methanol, 45 ml Aqua bidest, 10 ml Eisessig) und anschliessend entfärbt in 47,5% Methanol, 47,5% Aqua bidest, 5% Eisessig (v/v). (Das Entfärbebad muss 3 mal erneuert werden.) Danach werden die blauen Farbkomplexe ausgeschnitten und das verbleibende Cellulose-Acetat-Papier in 2 ml einer "Verdauungslösung" aus 80% Ameisensäure, 10% Eisessig und 10% Trichloressigsäure (v/v)aufgelöst. Daraufhin wird die Extinktion bei 630 nm (Zeiss Photometer PM Q II) gemessen.

Die Absolutbestimmung des Proteingehalts erfolgt mit Hilfe einer Eichkurve, zu deren Aufstellung eine Konzentrationsreihe aus Rinderserumalbumin vorgelegt wurde (0 - 50 µg BSA / 5 µl Lösung).

2.9. Lipidextraktion

Zur Extraktion der Membranlipide wird meist eine Mischung eines relativ apolaren Lösungsmittels (z.B. Chloroform) mit einem polaren Alkohol (meist Methanol) verwendet.
Die Lipidextraktion wird nach einer von COBON, CROWFOOT und LINNANE 1974 veröffentlichten Methode durchgeführt, die eine Modifikation der üblichen 'Bligh and Dyer-Methode' darstellt:

Zu 1 ml Mitochondrien-(Membran-)Suspension gibt man 3,75 ml Methanol-Chloroform (2:1, v/v) (siehe auch KARLA und BROOKS 1973). Unter gelegentlichem Rühren wird nach 20 min das präzipitierte Protein in einer Tischzentrifuge (Phywe P 3/6) sedimentiert. Dieses Sediment wird in 1 ml Waschmedium WB 2 resuspendiert und die Extraktion wiederholt.
Zu den vereinigten Überständen gibt man 2,5 ml Chloroform und 2,5 ml Aqua bidest. Nach gründlichem Schütteln wird die Lösung über Nacht zwischen 0° und 4°C aufbewahrt, wodurch sich ein Zweiphasensystem mit einer mehr oder weniger dicken Proteinschicht als Phasengrenze ausbildet. Die untere Chloroformphase, welche die Lipide enthält, wird mit einer Pasteurpipette abgenommen, unter Stickstoff-Strom zur Trockene gebracht und in einem definierten Volumen Chloroform (0,1 ml) gelöst.

2.10. Reinigung, Auftrennung und quantitative Bestimmung der Phospholipide

2.10.1. Eindimensionale Dünnschichtchromatographie zur Reinigung der Phospholipide

Glasplatten (20 cm x 20 cm, 9 mm dick) werden zur Entfernung von Fett- und Spülmittelrückständen mit Aceton und anschliessend mit Aqua bidest gereinigt (nach KATES 1975).
Kieselgel HR reinst Typ 60 wird nach Vorschrift der Firma Merck im Mörser streichfähig zerrieben und in einer Schichtdicke von 0,25 mm aufgetragen.
Unmittelbar vor Gebrauch werden die Platten bei 110°C für 60 min im Trockenschrank aktiviert.

Da Phospholipide im Gegensatz zu Neutral-, Glyco- und Sulfolipiden nicht in Aceton löslich sind (s. KATES 1975),wird der Gesamtlipidextrakt von 2.9. strichförmig unter Stickstoffstrom aufgetragen und anschliessend im Fliessmittel A (Aceton - Essigsäure - Aqua bidest = 100 : 2 : 1, v/v) entwickelt (nach SCHWERTNER und BIALE 1973, WARING, BREIDENBACH und LYONS 1976).
Die Phospolipide verbleiben dabei in der Auftragefront, während die anderen Lipidklassen je nach ihrer Acetonlöslichkeit hochwandern.

Die Kieselgelzone um die Auftragefront wird mit einem Spatel abgekratzt, die Phospholipide mit Methanol-Chloroform (2:1, v/v) eluiert und über Na_2SO_4 wasserfrei gemacht.
Nach dem Abzentrifugieren des Kieselgels werden die Phospholipide unter einem Stickstoffstrom zur Trockene gebracht und in einem definierten Volumen Chloroform (0,1 ml) aufgenommen.

2.10.2. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie zur Auftrennung der individuellen Phospholipidklassen

Die Auftrennung der Phospholipide erfolgt in Anlehnung an DOGRAS, DILLEY und HERNER 1977, JARVIS und DUNCAN 1974 und KATES 1975. Dazu werden Phospholipide (in 25 bis 50 µl Chloroform-Lösung) mit einer Hamilton-Spritze unter Stickstoff-Strom aufgetragen und zuerst im Fliessmittel 1 (Chloroform - Methanol - 25% Ammoniak = 60 : 40 : 5, v/v) entwickelt und anschliessend in die Küvette mit Fliessmittel 2 (Chloroform - Methanol - Eisessig - Aqua bidest= 85 : 15 : 10 : 3, v/v) eingestellt.

2.10.3. Nachweisreagentien zur Identifizierung der Phospholipide

2.10.3.1. Nachweisreagenz bei anschliessender Phosphatbestimmung

Wird anschliessend an die Dünnschichtchromatographie eine Phosphatbestimmung (s. 2.10.4) zur quantitativen Phospholipidzusammensetzung der Mitochondrien durchgeführt, so werden die entwickelten DC-Platten mit einem selbsthergestellten Phosphatspray nach VASKOVSKY,KOSTETSKY und VASENDIN 1975 besprüht. Die Phospholipidklassen treten dann als blaue Flecken auf weissem Hintergrund auf. Die Identifizierung der Lipide erfolgt durch den Vergleich mitReferenz-Phospholipiden, die entweder im Fliessmittel 1 oder Fliessmittel 2 entwickelt werden,wobei alle relevanten Phospholipide zur Verfügung standen, wie Phosphatidylinosit (PI), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidyläthanolamin (PE), Phosphatidsäure (PA) und Diphosphatidylglycerin (= Cardiolipin, CL).

2.10.3.2. Nachweisreagenz bei anschliessender Fettsäuren-Analyse

Führt man nach der Dünnschichtchromatographie eine Fettsäuren-Extraktion (s. 2.11.) durch, so werden die entwickelten DC-Platten mit einem Rhodaminspray nach POHL et al. (1970) besprüht. Dazu werden unmittelbar vor Gebrauch gleiche Volumina einer 8%igen NaOH- und einer 0,006%igen Rhodamin-6-G-Lösung vereinigt. Die Platte wird mit dieser Lösung gleichmässig durchfeuchtet und sofort unter UV-Licht (366 nm) betrachtet. Die Phospholipide sind dann als gelbe Flecken sichtbar (während eine blaugraue Farbe auf Oxidation der Lipide schliessen lässt).
Dem Nachteil des Rhodaminsprays - sowohl Neutral - als auch Phospholipide sind als gelbe Flecken sichtbar - steht der Vorteil gegenüber, dass dieser Spray bedeutend schonender ist, als der oben genannte Phosphatspray, so dass bei präparativen Platten seine Anwendung unumgänglich ist. Zudem sind nach der Lipid-Reinigung (s. 2.10.1) nur noch Phospholipide in der Chloroform-Lösung enthalten.

2.10.4. Quantitative Bestimmung der Phospholipide

Die quantitative Bestimmung der Phospholipide erfolgt nach der Methode von VASKOVSKY et al. (1975). Hierzu werden folgende Lösungen hergestellt:

Stammlösung:

0,4 g Hydraziniumdichlorid in 14 ml 4 n HCL lösen und mit 10 g ebenfalls in 4 n HCL (60 ml) gelöstem Na-Molybdat vereinigen, für 20 min in kochendem Wasserbad erhitzen, abkühlen lassen, 14 ml konzentrierte Schwefelsäure zugeben und mit Aqua bidest auf 100 ml auffüllen.

Arbeitslösung:

48 ml 1 n H_2SO_4 zu 4 ml Stammlösung geben und mit Aqua bidest auf 100 ml auffüllen.
Die nach 2.10.3.1. identifizierten Lipide werden von der DC-Platte abgekratzt und mit je 0,2 ml 70%iger Perchlorsäure bei 180°C für 20 min "verdaut". Nach dem Abkühlen werden je 4,8 ml Arbeitslösung zugegeben, die Lösung stark durchmischt und im kochenden Wasserbad für 15 min erhitzt. Dabei wird der Phosphat-Anteil des Lipids quantitativ umgesetzt zu Phosphomolybdänblau (PMB).

Dessen Konzentration kann nach dem Abkühlen und Abzentrifugieren des Kieselgels photometrisch bei 820 nm bestimmt werden.
Die Absolutbestimmung des Phosphatgehalts erfolgt mit Hilfe einer Eichkurve, zu deren Aufstellung eine Kalium-di-Hydrogenphosphat-Konzentrationsreihe vorgelegt wird (je 0,1 ml 0-2,5 mM KH_2PO_4-Lösung $\hat{=}$ 0 - 0,25 uMol Pi).

2.11. Fettsäuren-Analyse

2.11.1. Methylierung der Fettsäuren

Die nach 2.10.3.2. angefärbten Phospholipide werden von der DC-Platte mit 2,5 ml Benzol unter kräftigem Schütteln eluiert. Nach dem Abzentrifugieren des Kieselgels wird der Überstand in ein verschliessbares Reagenzglas überführt und unter Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft. Die Veresterung der Fettsäuren erfolgt nach KATES (1975) und SCHWERTNER und BIALE (1973) durch Zugabe von 2 ml methanolischer HCl (12% w/v) und anschliessendem Einstellen ins Wasserbad für 1 h bei 90°C.
Nach dem Abkühlen werden 2 ml Aqua bidest und 2 ml n-Hexan zugegeben und die Lösung kräftig geschüttelt. Durch anschliessendes Zentrifugieren bilden sich 2 Phasen aus. Die Oberphase aus n-Hexan (enthält die Fettsäuren) wird abgenommen, unter Stickstoffstrom zur Trockene gebracht und in einem definierten Volumen Chloroform (50 ul) aufgenommen.

2.11.2. Bestimmung der Fettsäuren-Zusammensetzung

Die Auftrennung der Fettsäurenmethylester sowohl nach der Kettenlänge (Anzahl der Kohlenstoffatome) als auch nach dem Sättigungsgrad wird mit Hilfe eines Gaschromatographen (v.a. nach KAISER 1973) durchgeführt. Dazu werden maximal 5 ul der Chloroform-Lösung von 2.11.1. eingespritzt. Die Methylester werden dabei durch eine polare Säule getrennt, und auf diese Weise die Retentionszeiten der Fettsäuremethylester ermittelt.

Die qualitative Analyse erfolgt sowohl durch den Vergleich dieser Retentionszeiten mit denen der Referenzsubstanzen, als auch durch Aufstellen einer Eichkurvenschar homologer Fettsäuren über die Referenzstandards der Fa. Serva.

Die quantitative Bestimmung wird entweder maschinell durch den an den Gaschromatographen angeschlossenen Rechner oder aber durch das Berechnen der Peakflächen (Peakhöhe x Retentionszeit) durchgeführt.

Folgende Geräte und Versuchsbedingungen werden bei der Analyse der Fettsäuremethylester angewandt:

Gaschromatograph	:	Varian aerograph series 2700 mit Flammenionisationsdetektor (FID)
Schreiber	:	Varian A-25 (Schreibergeschwindigkeit 1 cm/min)
Rechner	:	Autolab System IVB von Spectra-Physics

Polare Säule	
Trägermaterial	WAW/DMCS
Beschichtung	2,5% EGA auf Chromosorb G
Länge und Durchmesser	6' x 1/8"
Temperatur-Maximum	225°C

Injektortemperatur	250°C
Detektortemperatur	250°C
Säulentemperatur bei isothermer Analyse	187°C

Trägergas	:	99,996%iger Stickstoff (Durchflussgeschwindigkeit 30 ml/min)
Gase für Flamme	:	synthetische Luft (Durchflussgeschwindigkeit 200 ml/min) und Wasserstoff (Durchflussgeschwindigkeit 20 ml/min)

2.12. Elektronenmikroskopie

Die Mitochondriensuspensionen werden mit 2,5%iger Glutaraldehyd-Lösung (in 0,3 M Saccharose) für 1 h vorfixiert und nach anschliessendem Waschen in Waschmedium WB 2 bzw. WK bei 10000 x g für 20 min abzentrifugiert.

Das Sediment wird 120 min mit 1%iger OsO_4-Lösung bei $4^{\circ}C$ behandelt, worauf sich eine weitere Fixierung mit 1%iger $KMnO_4$-Lösung für 60 min bei $4^{\circ}C$ anschliesst. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua bidest und einer 30-minütigen Kontrastierung mit 1%iger Uranylacetat-Lösung erfolgt eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur und eine Infiltration mit ansteigender ERL-Konzentration. Nach dem Einbetten der Proben in ERL wird die Polymerisierung bei $70^{\circ}C$ für 8 h durchgeführt.
Das eingebettete Material kann nun geschnitten und der elektronenmikroskopischen Untersuchung zugeleitet werden.[x]

2.13. Statistik

Zur statistischen Absicherung werden die Anzahl der Einzelversuche, der Mittelwert, die Standardabweichung und der mittlere Fehler des Mittelwerts angegeben. Reichen diese Angaben für eine signifikante Unterscheidung aus, wird auf weitere statistische Prüfverfahren verzichtet. In den anderen Fällen werden die Irrtumswahrscheinlichkeiten p für den zweiseitigen U-Test von Mann und Whitney angegeben (aus CLAUSS und EBNER, 1971).

[x]Frau Deml und Herrn Dr. Blanz danke ich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten.

3. ERGEBNISSE
TEIL 1: METHODISCHE VORAUSSETZUNGEN

3.1. Zur Reinigung der Mitochondrienfraktion aus grünen Blättern mit Hilfe eines isopyknischen Ludox-Gradienten

Bisher wurden zahlreiche Techniken zur Isolierung von Mitochondrien aus Speichergewebe bzw. etioliertem Gewebe entwickelt (Übersicht bei LATIES 1974, BONNER Jr. 1967 und Arbeiten z.B. von DAY und WISKICH 1974, DOUCE et al. 1972).

Im Gegensatz dazu wurden bisher noch nicht viele Methoden veröffentlicht, die über eine erfolgreiche Isolierung von Mitochondrien aus Blättern höherer Pflanzen berichten (ZELITCH 1967 GRONEBAUM-TURCK und WILLENBRINK 1971, IKUMA 1972,PALMER 1976, DOUCE et al. 1977, GARDESTROM et al. 1978).
Deshalb liegen relativ wenige Informationen über Vorgänge der oxidativen Phosphorylierung bei Mitochondrien aus grünen Blättern vor.

Dieser Umstand beruht vor allem auf der starken Kontamination der Mitochondriensuspension mit Chloroplastenbruchstücken und der weiteren Schwierigkeit, einigermassen gut gekoppelte Mitochondrien aus grünen Blättern trotz aufwendiger Reinigungsschritte zu erhalten.
Andererseits ist es unumgänglich, unter dem Aspekt der vergleichenden Untersuchung an einer höheren Pflanze (Oenothera), welche weder chloroplastenfreie Speicherorgane noch sonstige etiolierte Gewebe aufweist, zuerst eine erfolgversprechende Methode der Mitochondrienisolierung aus grünen Blättern speziell bei Oenothera zu entwickeln.

Die besten Ergebnisse werden dabei mit dem unter 2.4.1. beschriebenen Verfahren erzielt. Zwar weist die Mitochondrien-Rohfraktion nach der differentiellen Zentrifugation noch eine deutliche Grünfärbung auf und ist demnach noch stark mit Thylakoidbruchstücken verunreinigt (s.Abb. 4), doch zeigen schon diese Mitochondrien eine ausreichende Kopplung (s.4.1.), so dass Versuche zur Bestimmung der Atmungsaktivität bereits mit dieser nicht weiter gereinigten Mitochondriensuspension durchgeführt werden können.

Um jedoch Aussagen über die Phospholipid- und Fettsäuren-Zusammensetzung der Mitochondrien, resp. ihrer Membranen, treffen zu können, muss die Rohfraktion weiter gereinigt und vor allem von den Chloroplastenbruchstücken befreit werden. Dies geschieht mit Hilfe eines isopyknischen Dichtegradienten aus Ludox. Ludox ist ein kolloidales Kieselsäuresol in wässriger Dispersion. Es besteht aus kompakten, distinkten und sphärischen SiO_2-Partikeln, die einen Durchmesser von 7 - 24 nm (Ludox HS 40 13 - 14 nm) aufweisen (RICKWOOD 1978, SCHMITT und HERRMANN 1977).
Das verwendete Ludox HS 40 enthält 40% SiO_2; das entspricht einer spezifischen Dichte von 1,30 $g.cm^{-3}$. Die Vorteile der Kieselsäuresole gegenüber anderen Gradientenmedien sind im folgenden aufgeführt:

1. geringe Osmolarität (Ludox HS 40: 80 mOsm)
2. nicht toxisch
3. wenig viskos (Ludox HS 40: 17,5 cp)
4. temperaturstabil von $+2^{\circ}$ bis $130^{\circ}C$
5. im physiologischen Bereich pH-Wert-stabil
   (bei $pH \leqslant 6$, bzw. bei einer Elektrolyt-Konzentration $\geqslant 0{,}2$ M beginnt Ludox zu gelieren)
6. kurze Zentrifugationszeiten bei geringer Beschleunigung
7. Gradient baut sich bei der Zentrifugation von selbst auf
8. durch die Zugabe von polymeren Stoffen (z.B.PVP, Ficoll, PEG oder Dextran) wird erreicht, dass Ludox weder an biologische Membranen bindet, noch durch diese permeiert, so dass die Organellen wesentlich näher bei den theoretischen Werten ihrer Dichte gefunden werden (s. PERTOFT 1969, SCHMITT und HERMANN 1977, RICKWOOD 1978 und Produktinformation der Deutschen Pharmacia GmbH, Freiburg 1978 für "PERCOLL TM").

Die nach 2.4.1. hergestellte 45%ige Ludox-Lösung (35 ml) wird mit 5 ml der Mitochondrien-Rohfraktion überschichtet und im Festwinkelrotor (Sorvall SS 34) zentrifugiert. Schon eine Zentrifugationszeit von 7 min bei lediglich 5000 x g reicht zu einer Trennung aus, wobei die Mitochondrien auf dem Kieselsäuresol flottieren, während die Thylakoidbruchstücke entsprechend ihrer höheren Dichte sedimentieren (s. Abb. 3).

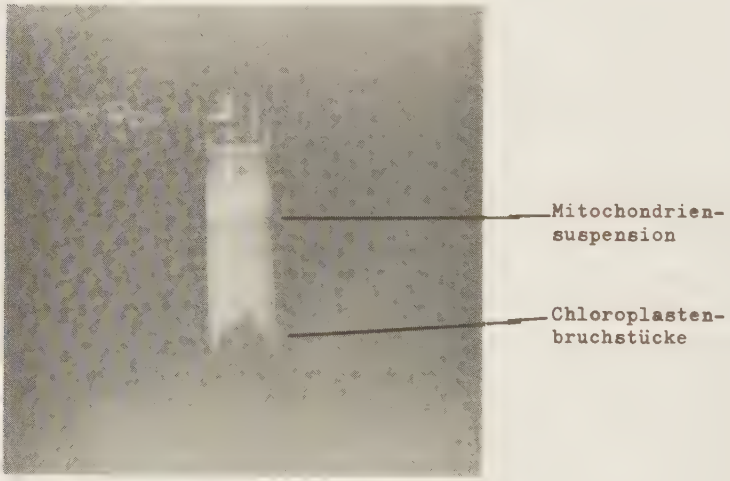


Abb. 3 : Ludox-Gradient nach Zentrifugation.

Diese 2., gereinigte Mitochondrienfraktion enthält ausser SiO_2-Partikeln praktisch nur Mitochondrien. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowohl der Rohfraktion als auch der gereinigten Mitochondriensuspension zeigen die Abb. 4 und Abb. 5

Abb. 4: EM-Aufnahme der Mitochondrien-Rohfraktion, isoliert aus grünen Blättern des Oenotherenbastards lv mit odorata Plasmon.

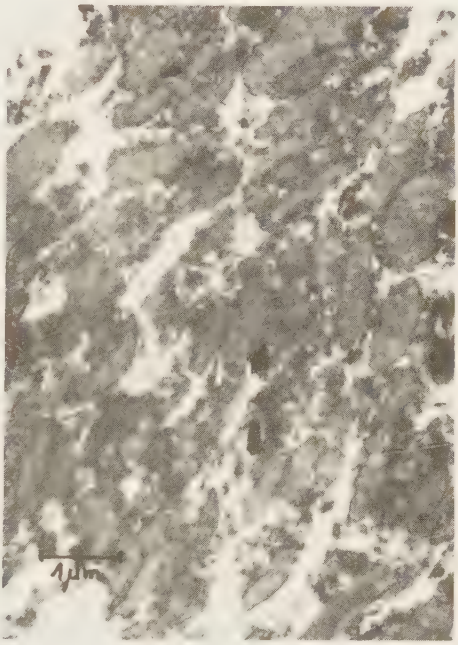


Abb. 5: EM-Aufnahme der über den Ludox-Gradienten gereinigten Mitochondriensuspension, isoliert aus grünen Blättern des Oenotherenbastards lv mit odorata Plasmon.

3.2. Eichkurve zur Proteinbestimmung

Um den Proteingehalt der Mitochondriensuspensionen bestimmen zu können, wird eine Eichkurve nach 2.5. aufgenommen. In der nachfolgenden Abbildung ist diese Eichkurve graphisch dargestellt:

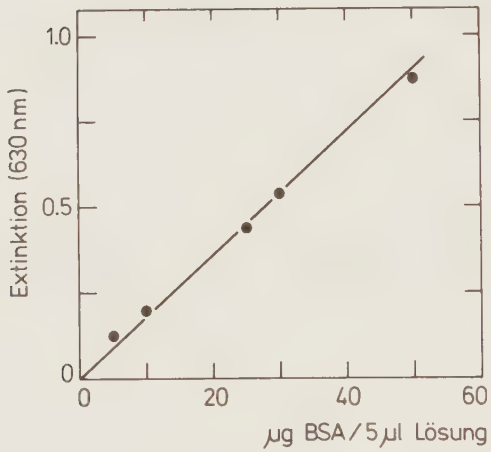


Abb. 6 : Eichkurve zur Proteinbestimmung.
Die rechnerisch ermittelte Regressionsgerade lautet: $y = 0{,}017\ x + 0{,}02$,
das Bestimmtheitsmass: $r^2 = 0{,}998$

Die gemessenen Extinktionen der Mitochondriensuspensionen liegen alle zwischen 0,1 und 0,7 , d.h. im linearen Bereich der Eichkurve.

3.3. Eichkurve zur Phosphatbestimmung

Die Phospholipid-Zusammensetzung der Mitochondrien bzw. der Membranen wird über den Phosphatgehalt der einzelnen Phospholipide bestimmt.
Dazu wird eine Eichkurve nach 2.10.4. erstellt, die unten abgebildet ist:

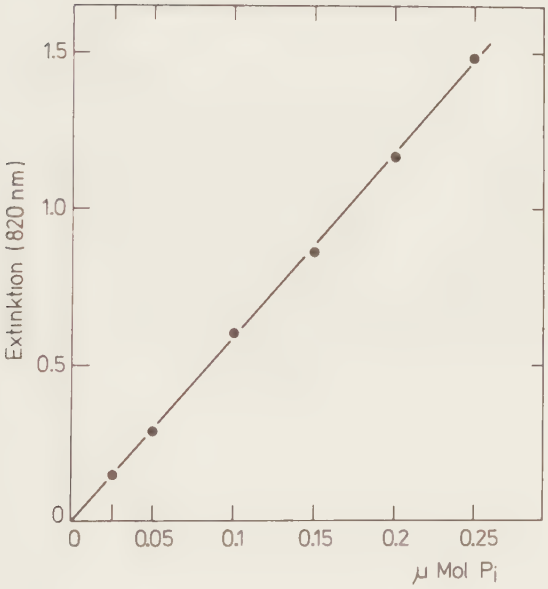


Abb. 7: Eichkurve zur Phosphatbestimmung
Die errechnete Regressionsgerade lautet: $y = 5{,}87\ x$,
das Bestimmtheitsmass: $r^2 = 0{,}9996$.

Die gemessenen Extinktionen der Phospholipide liegen alle zwischen 0,05 und 1,2, d.h. noch im linearen Bereich der Eichkurve.

3.4. Eichkurvenschar zur Identifizierung der Fettsäuren

Für gesättigte Fettsäuren gilt, wie für alle homologen Reihen, dass bei gleichen Versuchsbedingungen der Logarithmus der relativen Retentionszeit direkt proportional zur Kettenlänge n (Anzahl der C-Atome) ist, wobei man unter der relativen Retentionszeit den Quotienten aus der Retentionszeit tn einer Substanz (mit n C-Atomen) zur Retentionszeit ts einer Referenzsubstanz S versteht:

$$\log \frac{tn}{ts} \sim n$$

Die graphische Darstellung einiger relativer Retentionszeiten gesättigter Fettsäuren - immer bezogen auf dieselbe Referenzsubstanz - ergibt demnach eine Gerade (s. Abb. 9), mit deren Hilfe weitere gesättigte Fettsäuren bestimmt werden können (s. KATES, 1975)
Trennt man nun auf der EGA-Säule auch ungesättigte Fettsäuren, so weisen diese je nach Anzahl der Doppelbindungen eine entsprechend höhere Retentionszeit gegenüber der korrespondierenden gesättigten Fettsäure auf. Da aber die oben erwähnte Proportionalität weiter bestehen bleibt, liegen alle einfach ungesättigten Fettsäuren auf einer Geraden, die lediglich um den Logarithmus des ungesättigten Trennungsfaktors (Quotient aus Retentionszeit der ungesättigten Fettsäure zur Retentionszeit der korrespondierenden gesättigten Fettsäure) parallel verschoben ist (s. KATES 1975, ACKMAN 1969). Dies gilt analog natürlich auch für mehrfach ungesättigte Fettsäuren, so dass mit den zur Verfügung stehenden Standards (s. 2.11.) alle relevanten Fettsäuren bestimmt werden können (s. Abb. 8).

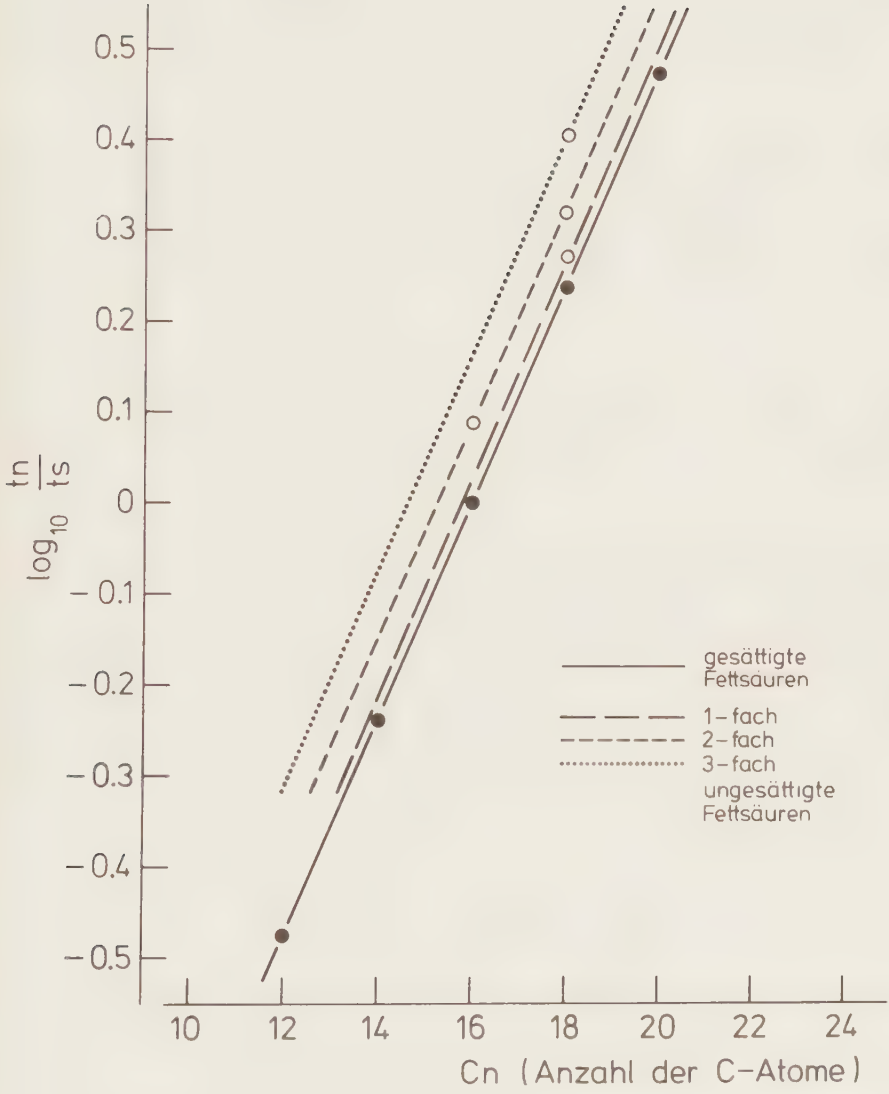


Abb. 8: Eichkurvenschar zur Bestimmung der relevanten Fettsäuren, ermittelt aus
den Standards NIH D (14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1)
NIH F (14:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0)
K 108 (16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3)

Die Referenzsubstanz S ist Palmitinsäure
(16:0, d.h. 16 C-Atome, keine Doppelbindung).

4. ERGEBNISSE

TEIL 2: DER EINFLUSS DES CYTOPLASMONS AUF DIE ATMUNGS-AKTIVITÄT ISOLIERTER MITOCHONDRIEN

Vorbemerkung:

Um vergleichend biochemische Untersuchungen durchführen zu können, ist es unabdingbar, dass die nach 2.4. isolierten Mitochondrien stoffwechselphysiologisch intakt sind, und die erzielten Differenzen nicht durch eine unbefriedigende Isolierung vorgetäuscht werden. Zahlreiche Autoren (z.B. CHANCE und WILLIAMS 1956, LEHNINGER 1964, BONNER 1967, HALL et al. 1974, SMITH 1977) bemühten sich, Kriterien festzulegen, die als Mass für die Qualität der Mitochondriensuspension herangezogen werden können:

Isolierte Mitochondrien sollten praktisch alle Metaboliten des Zitronensäurezyklus' in der Weise veratmen, dass die endogene Atmung (state 1, ohne Zugabe einer Säure aus dem Krebszyklus) relativ gering ist, während die Atmungsrate nach Zugabe der Säure erheblich höher sein sollte (Substratatmung, state 4_o).

Weiter müssen isolierte Mitochondrien die Fähigkeit zur oxidativen Phosphorylierung besitzen, d.h. eine strenge Kopplung zwischen Atmungskette und ATP-Synthese muss nachweisbar sein: Wird beispielsweise reduziertes NADH der Mitochondriensuspension angeboten, so wird dieses durch molekularen Sauerstoff über die Atmungskette oxidiert, wobei nach MITCHELL (1961 u. 1968) die freiwerdende Energie zum Aufbau eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran verbraucht wird. Dieser H^+-Gradient wiederum ermöglicht die Phosphorylierung von ADP zu ATP. Da das Gesamtsystem der Atmung bekanntlich durch das Reaktionsgleichgewicht von ADP zu ATP reguliert wird, spricht man von der Atmungskontrolle durch den Schlüsselmetabolit ADP der mitochondrialen Atmung: So läuft im normalen Zustand ($[ADP] \leqslant [ATP]$) die Redoxreaktion der Atmungskette nicht mit maximaler Geschwindigkeit ab, obwohl Substrat und Sauerstoff hinreichend verfügbar sind.
Erst nach Zugabe von ADP wird eine höhere Atmungsrate erreicht (state 3 bzw. aktiver Zustand). Diese geht nach Phosphorylierung des zugesetzten ADP zu ATP ($[ADP] = [ATP]$) wieder auf den ursprünglichen Wert zurück (state 4_1).

Daraus lässt sich unmittelbar ein weiteres Mass für den Erhaltungszustand der Mitochondrien ableiten, der als RCR (respiratory control ratio) bezeichnete Quotient aus der Atmungsrate in state 3 zur Atmungsrate in state 4_1. Dieser Wert sollte bei pflanzlichen Mitochondrien generell zwischen 2 und 10 liegen (HALL 1974).

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum physiologisch intakter Mitochondrien, der P/O-Quotient, geht ebenfalls aus dem oben gesagten hervor (Bestimmung s. 2.5.3.): Wird beispielsweise 1 Mol NADH mit 1/2 Mol O_2 oxidiert, so werden 3 Mole ATP aus 3 Molen ADP und 3 Molen anorganischem Phosphat (Pi) synthetisiert.

Der theoretische P/O-Quotient beträgt für endogenes NADH also 3. Bei sauber isolierten Mitochondrien sollte demnach der nach 2.5.3. bestimmte tatsächliche P/O-Quotient für intramitochondriales NADH ebenfalls zwischen 2 und 3 liegen.

Da Malat im Zitronensäurezyklus zu Oxalacetat unter Bildung von NADH oxidiert wird, beträgt der theoretische P/O-Wert ebenfalls 3. Anders verhält es sich dagegen bei Succinat als Substrat. Bei der Oxidation zu Fumarat wird lediglich $FADH_2$ gebildet. Dieses Coenzym liefert nur noch 2 Mole ATP, so dass der theoretische P/O-Wert nur 2 beträgt.

Die folgenden Polarographien und Tabellen zeigen zum einen die oben angeführten Kriterien, zum anderen machen sie den Einfluss des Cytoplasmons auf die Atmungsaktivität deutlich.

4.1. Charakterisierung und Vergleich der Atmungsraten der Mitochondrien-Rohfraktionen

Bereits die nicht weiter über einen Dichtegradienten gereinigten Mitochondrien-Rohfraktionen, die noch eine deutliche Grünfärbung, also starke Kontamination mit Chloroplastenbruchstücken, aufweisen, oxidieren die eingesetzten Substrate des Krebszyklus bzw. der Atmungskette wie die folgenden Polarographien (Abb. 9 u. 11) zeigen.

Einer relativ geringen endogenen Atmung der isolierten Mitochondrien (state 1) folgt eine erhöhte Atmungsrate nach Substratzugabe (state 4_o). Anschliessend erkennt man die nach ADP-Zugabe deutlich gesteigerten state 3-Zustände, sowie die verlangsamten state 4_1-Raten nach Verbrauch des applizierten ADP, so dass die RC-Werte je nach Substrat und Mitochondrientyp zwischen 2,3 und 3,9 liegen. Auch die errechneten P/O-Quotienten liegen für Malat und Succinat im theoretischen Bereich. Eine deutliche Differenz tritt dagegen für den P/O-Quotienten für exogenes NADH auf: Während die Fraktion mit berteriana-Mitochondrien nur 2 Phosphorylierungsstellen nutzt (P/O = 1,8), scheinen die odorata-Mitochondrien in der Lage zu sein, pro Molekül NADH 3 Moleküle ATP zu synthetisieren.

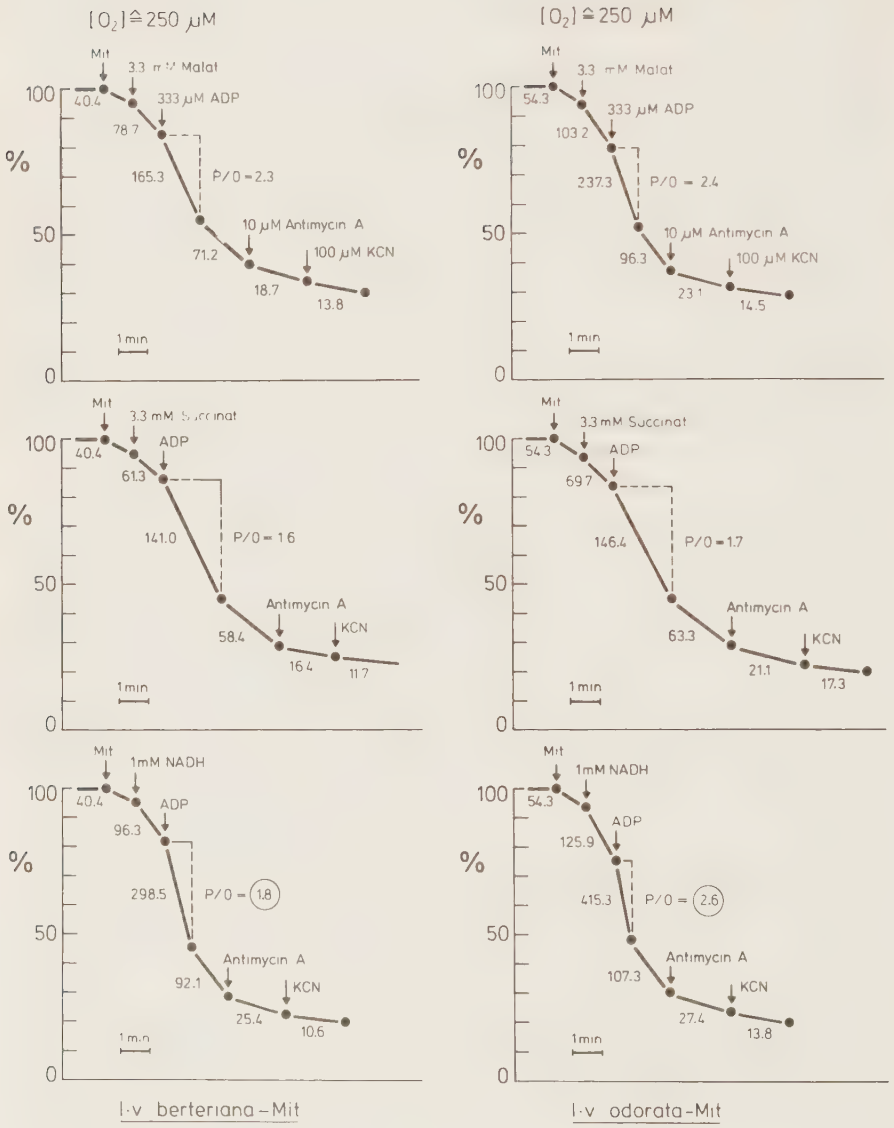


Abb. 9 : Oxidation von Malat, Succinat und NADH durch Mitochondrien, isoliert aus Blättern des reziproken Oenotheren-Bastardpaares mit lv Genom und berteriana bzw. odorata Plasmon. (Die Zahlenangaben unter der Polarographiekurve geben den O_2-Verbrauch in nmol O_2/min. mg Protein wider, 100% $[O_2]$ ≙ 750 nMol O_2).

Weiter wird in allen Polarographien der Einfluss der Atmungsgifte Antimycin A und KCN deutlich: Der Sauerstoffverbrauch aller Fraktionen nimmt offensichtlich, unabhängig von Substrat und Mitochondrientyp, stark ab, ohne jedoch ganz unterbunden zu werden. Selbst nach KCN-Zugabe lässt sich noch eine geringe Restatmung nachweisen, die aber geringer ist als die endogene Atmung.
Dies legt den Schluss nahe, dass auch Oenotheren-Mitochondrien sowohl eine Cyanid-resistente als auch eine Antimycin-A-insensitive Atmung aufrecht erhalten können, wobei der Bypass im Komplex III für Antimycin A offensichtlich ausgeprägter ist (s. Diskussion).

Vergleicht man nun die Atmungszustände der beiden reziproken Bastarde untereinander, so fällt auf, dass der O_2-Verbrauch der odorata-Mitochondrien generell höher liegt, wobei die Differenzen je nach Substrat zwischen 13,7% und 34,5% betragen. Dies veranschaulicht die nachfolgende Tabelle:

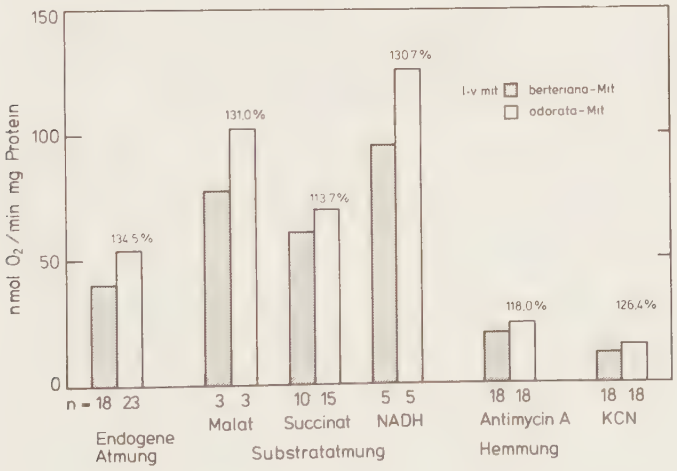


Abb. 10 : Vergleich verschiedener Atmungszustände isolierter Mitochondrien aus grünen Blättern des Oenotheren-Bastards lv mit berteriana bzw. odorata Plasmon. (Die Werte für berteriana-Mitochondrien werden gleich 100% gesetzt.)

Zur statistischen Absicherung werden die Mittelwerte, die Standardabweichung, der mittlere Fehler des Mittelwerts sowie die Anzahl der Einzelversuche in einer Tabelle zusammengefasst:

Anzahl der Versuche (n)	bert.Pl. od.Pl.	18 23	10 15	3 3	5 5
Mittelwert ± Standardabweichung, mittlerer Fehler des Mittelwerts ($\Delta\bar{x}$)	bert.Pl.	40.37±2,25 ($\Delta\bar{x}$=0,53)	78,74±5 ($\Delta\bar{x}$=1,58)	61,3±5,37 ($\Delta\bar{x}$=3,1)	96,28±4,76 ($\Delta\bar{x}$=2,13)
	od.Pl.	54,29±4,24 ($\Delta\bar{x}$=0,93)	103,16±8,25 ($\Delta\bar{x}$=2,13)	69,7±2,96 ($\Delta\bar{x}$=1,71)	125,86±9,58 ($\Delta\bar{x}$=4,28)
Atmungszustand:		Endogene Atmung	Substratatmung mit: Malat	Succinat	NADH

Tab. 5 : Mittelwerte, Standardabweichungen, mittlerer Fehler des Mittelwerts und Anzahl der Versuche zur Bestimmung verschiedener Atmungszustände isolierter Mitochondrien aus grünen Blättern des Oenotherenbastardpaars 1v (vgl. Abb. 9).

Es ist also evident, dass sich die odorata-Mitochondrien von denen des berteriana Typs beim Bastard 1v hinsichtlich der verschiedenen Atmungszustände signifikant unterscheiden.

Um den extrachromosomalen Einfluss weiter zu sichern, wurden gemeinsam mit MAUTE (1978) Mitochondrien aus Blättern der Elternform Oenothera odorata (mit odorata Plasmon) und einer genomgleichen Form mit berteriana Plasmon mit den gleichen Methoden isoliert und untersucht.

Auch diese Mitochondrien-Rohfraktionen oxidieren die eingesetzten Substrate Malat, Succinat und NADH in derselben Weise wie die Mitochondrienfraktionen des Bastardpaars 1v, doch liegen die RC-Indices etwas niedriger (alle zwischen 1 und 2, was auf eine nicht ganz optimale Isolierung schliessen lässt). Die P/O-Quotienten dagegen erreichen - wieder mit Ausnahme von NADH - fast die erwarteten theoretischen Werte, während auch bei diesen Versuchen die Mitochondrien des berteriana Typs bei Oxidation von NADH nur 2 Phosphorylierungsstellen nutzen, die des odorata Typs aber offensichtlich alle 3 sites in Anspruch nehmen (s.Abb.11 auf der nächsten Seite).

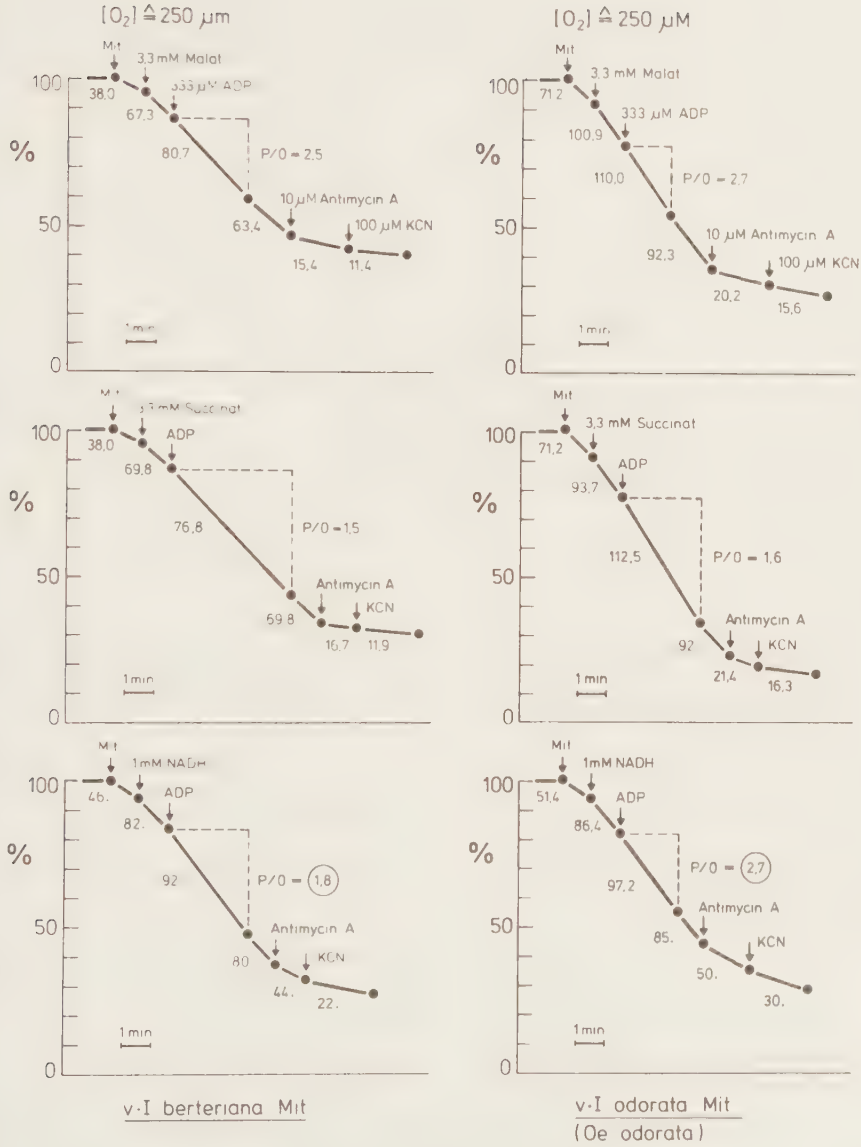


Abb. 11 : Oxidation von Malat, Succinat und NADH durch Mitochondrien-Rohfraktionen, isoliert aus Blättern der Oenothera odorata und der genomgleichen Form mit berteriana Plasmon.(Die Zahlenangaben unter der Polarographiekurve geben den Verbrauch in nmol O_2/min.mg Protein wider, 100% $[O_2]$ ≙ 750 nMol O_2).

Werden nun wieder die Atmungszustände der beiden genomgleichen Oenotheren-Formen direkt miteinander verglichen, so zeigt sich die schon beim Oenotheren Bastardpaar 1v beobachtete Tendenz: Auch hier weisen die odorata-Mitochondrien in allen Atmungszuständen einen z.T. beträchtlich höheren O_2-Verbrauch auf, wobei die Differenz je nach Substrat zwischen 5,4% und 87,4% betragen (s. Abb. 12).

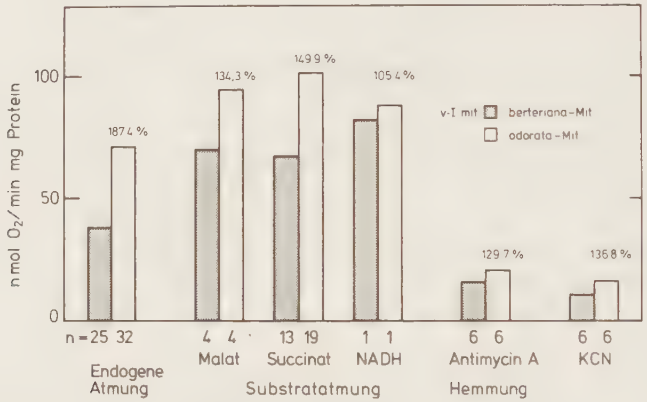


Abb. 12 : Vergleich verschiedener Atmungszustände isolierter Mitochondrien aus grünen Blättern der Oenothera odorata und der genomgleichen Form mit berteriana Plasmon (berteriana-Mitochondrien = 100%)

Die erzielten Ergebnisse zeigen eindrucksvoll den gerichteten Einfluss der mt-DNA: Mitochondrien des odorata Typs weisen unabhängig vom Genom eine höhere Atmungsrate im Vergleich zu berteriana-Mitochondrien auf.

4.2. Charakterisierung und Vergleich der Atmungsraten gereinigter Mitochondrien-Suspensionen

Wie bereits erwähnt, zeigen die lediglich über eine differentielle Zentrifugation isolierten Mitochondrien eine sehr deutliche Grünfärbung, also eine starke Kontamination mit Chloroplastenbruchstücken.
Da es jedoch im Hinblick auf die in Ergebnisteil 3 beschriebenen Versuche unumgänglich ist, hoch gereinigte Mitochondrien zu erhalten, werden die Rohfraktionen weiter über einen isopyknischen Ludox-Gradienten gereinigt. Die nachfolgenden Polarographien (Abb.13) zeigen, dass auch die gereinigten Mitochondrien-Suspensionen die verwendeten Substrate in der gleichen Weise wie die Rohfraktionen oxidieren, also keine Schädigung der Mitochondrien durch das Kieselsäuresol erfolgt.

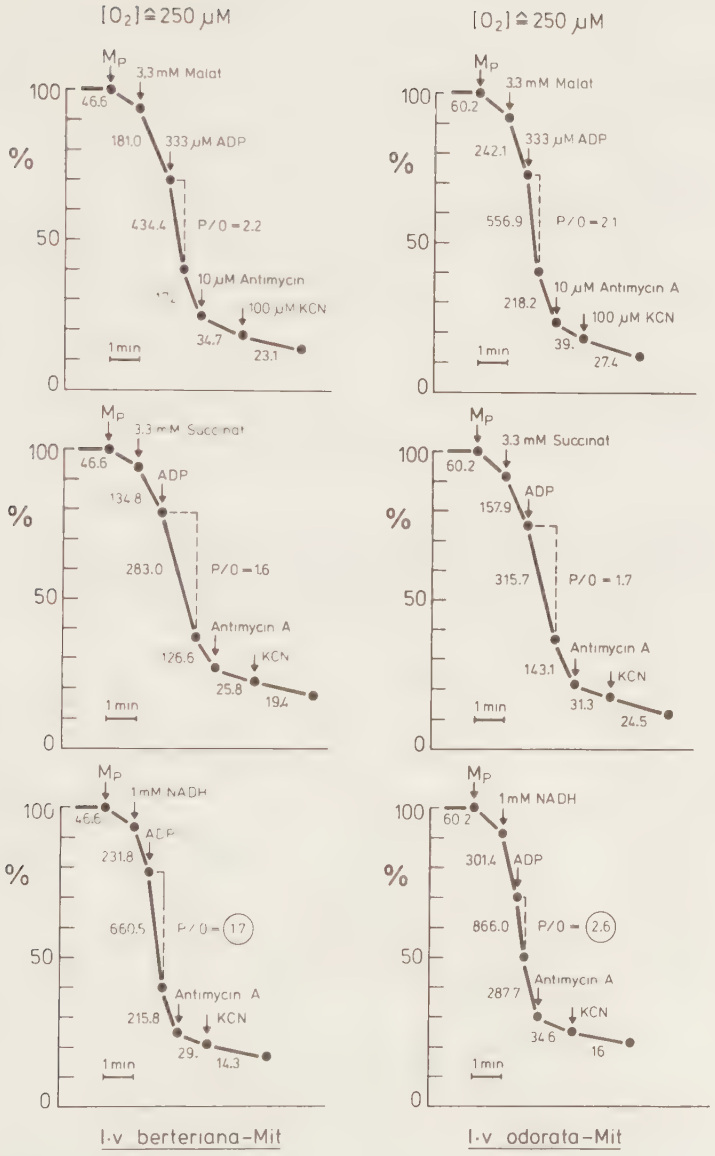


Abb. 13: Oxidation von Malat, Succinat und NADH durch gereinigte Mitochondrien-Suspensionen, isoliert aus Blättern des reziproken Oenotheren-Bastardpaars mit lv Genom und berteriana bzw. odorata Plasmon. (Die Zahlenangaben unter der Polarographiekurve geben den Sauerstoffverbrauch in nmol O_2/min. mg Protein wider.)

Wie bei den Rohfraktionen liegen die erhaltenen RC-Indices zwischen 2,25 und 3,1. Ebenso stimmen die P/O-Quotienten mit denen der Rohfraktionen überein, d.h. auch nach der Reinigung über den Ludox-Gradienten liegt der P/O-Wert beim Substrat NADH für berteriana-Mitochondrien nahe bei 2, während odorata-Mitochondrien einen P/O-Quotienten von 2,6 aufweisen.

Die gegenüber den ungereinigten Fraktionen deutlich erhöhten Raten für den Sauerstoffverbrauch (in nmol O_2/min. mg Protein) der Atmungszustände lassen sich dadurch erklären, dass durch die Reinigung über den Gradienten bei der nachfolgenden Proteinbestimmung lediglich noch mitochondriale Proteine erfasst werden, wohingegen bei den Rohfraktionen noch grosse Mengen an Fremdproteinen mitbestimmt werden. So liegt die Proteinkonzentration bei den Rohfraktionen zwischen ~5 und ~8 mg Protein/ml Suspension, während nach der Reinigung über den Ludox-Gradienten nur noch zwischen 0,5 und 2 mg Protein/ml Mitochondrien-Suspension enthalten sind.

Bringt man nun wiederum einige Atmungszustände des reziproken Bastardpaars untereinander in Beziehung, so erhält man die gleichen Differenzen wie bei ungereinigten Mitochondrien, d.h. auch hier liegen generell die Atmungsraten der odorata-Mitochondrien höher (s. Abb. 14).

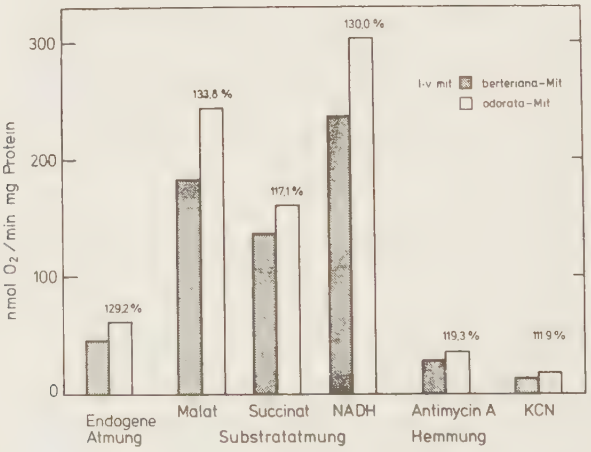


Abb. 14 : Vergleich einiger Atmungszustände gereinigter Mitochondrien aus grünen Blättern des Bastardpaars lv mit berteriana bzw. odorata Plasmon (berteriana-Mitochondrien = 100%).

Die Signifikanz der erhaltenen Differenzen wird durch die statistischen Angaben in Tabelle 6 belegt:

Anzahl der Versuche	bert.Pl.	15	5	5	5
	od.Pl.	15	5	5	5
Mittelwert ± Standardabweichung, mittlerer Fehler des Mittelwerts ($\Delta\bar{x}$)	bert.Pl.	46,6±3,3 ($\Delta\bar{x}$=0,85)	181 ± 3,82 ($\Delta\bar{x}$=1,71)	134,8±7,3 ($\Delta\bar{x}$=3,26)	231,8±14,6 ($\Delta\bar{x}$=6,53)
	od.Pl.	60,2±3,4 ($\Delta\bar{x}$=0,88)	242,1±10,4 ($\Delta\bar{x}$=4,65)	157,9±16 ($\Delta\bar{x}$=7,15)	301,4±21,7 ($\Delta\bar{x}$=9,7)
Atmungszustand		Endogene Atmung	Substratatmung mit: Malat	Succinat	NADH

Tab. 6 : Anzahl der Versuche, Mittelwerte, Standardabweichungen und mittlerer Fehler des Mittelwerts zur Abb. 13 (gereinigte Mitochondrien aus grünen Blättern des Oenotheren-Bastardpaars lv).

Wie zu erwarten war, bleiben die für die Rohfraktion gefundenen Prozent-Differenzen zwischen den odorata-und berteriana-Mitochondrien auch nach der Reinigung über den Ludox-Gradienten erhalten, wie die anschliessende Gegenüberstellung zeigt:

Atmungszustand		Prozent-Differenz: Rohfraktion	gereinigte Mitochondrien
Endogene Atmung		34,5%	29,2%
Substratatmung mit:	Malat	31 %	33,8%
	Succinat	13,7%	17,1%
	NADH	30,7%	30 %

Tab. 7 : Prozent-Differenz zwischen odorata-und berteriana-Mitochondrien des Bastardpaars lv bei einigen Atmungszuständen vor (Rohfraktion) und nach Reinigung über einen Ludox-Gradienten (gereinigte Mitochondrien).

Es kann also festgestellt werden, dass gereinigte Mitochondrien dieselben biochemischen Charakteristika wie die Rohfraktionen zeigen, d.h. der Ludox-Gradient beeinflusst die physiologische Aktivität der isolierten Mitochondrien in keiner Weise. Darüberhinaus wird über die Gradientenzentrifugation mit Ludox die erwünschte Abtrennung der Chloroplastenbruchstücke und eine gewisse Anreicherung der Mitochondrien erreicht, wie sowohl aus den höheren spezifischen Atmungsraten als auch aus der elektronenmikroskopischen Aufnahme (s. Abb. 5) ersichtlich ist.

4.3. Charakterisierung der Atmungsraten der Kallus-Mitochondrien

Wie bereits erwähnt, ist die Isolierung von Blatt-Mitochondrien und die anschliessende Reinigung über den Ludox-Gradienten sehr zeitaufwendig. Zudem erhält man nur eine relativ geringe Ausbeute an Mitochondrien (ca. 2 mg mt-Protein aus 80 g Blattgewebe). Um in ausreichendem Masse homogene, möglichst undifferenzierte Zellen für die Mitochondrienisolierung zur Verfügung zu haben, werden Gewebekulturen der Oenothera berteriana angelegt. Schon nach einer zweimaligen differentiellen Zentrifugation (s.2.4.) ist die Mitochondriensuspension relativ homogen, so dass auf eine anschliessende Gradientenzentrifugation verzichtet werden kann. Die Atmungsraten der auf diese Weise isolierten Mitochondrien aus Gewebekulturen liegen etwa in der gleichen Grössenordnung wie die der gereinigten Mitochondrien (s. Abb. 15).

Auch hier sei auf den extrachromosomalen Einfluss hingewiesen: Obwohl die Elternform Oenothera berteriana eine erheblich andere Zusammensetzung des diploiden Chromosomensatzes aufweist als das bisher untersuchte Bastardpaar (die Komplexe B und l statt l und v), verhalten sich die isolierten Mitochondrien wie "typische berteriana-Mitochondrien": Auch sie phosphorylieren lediglich 2 Moleküle ATP pro Molekül NADH.

4.4. Vergleich der spezifischen Aktivitäten einiger mitochondrialer Enzyme des reziproken Bastardpaars lv

Da sich, wie gezeigt, die mitochondrialen Typen in ihrer Atmungsaktivität z.T. erheblich unterscheiden, werden in weiteren Versuchen die spezifischen Aktivitäten einiger mitochondrialer Enzyme bestimmt, um den Angriffspunkt der extrachromosomalen Vererbung in der Atmungskette genauer fassen zu können.

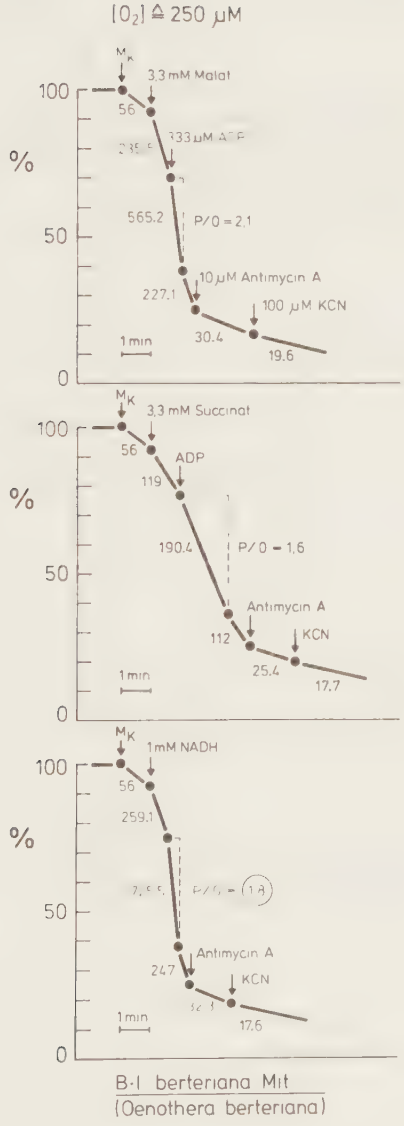


Abb. 15 : Oxidation von Malat, Succinat und NADH durch Mitochondrien, isoliert aus Kallusgewebe der Oenothera berteriana. (Die Zahlenangaben unter der Polarographiekurve geben den Sauerstoff-Verbrauch in nmol O_2/min. mg Protein wider.)

Deshalb werden aus der umfangreichen Enzym-Ausstattung der Mitochondrien in erster Linie solche Enzyme untersucht, die bei der Oxidation der zur Bestimmung der Atmungsrate eingesetzten Substrate beteiligt sind (eine gute Zusammenstellung mitochondrialer Enyme und ihrer Zuordnung zu den Kompartimentenwurde zuerst von ERNSTER und KUYLENSTIERNA, 1970 veröffentlicht).

Aus der vorliegenden Untersuchung ergibt sich, dass odorata Mitochondrien wiederum bei allen getesteten Enzymen eine höhere spezifische Aktivität aufweisen.[x]
Die Signifikanz dieser Unterschiede wird durch die angegebenen Irrtumswahrscheinlichkeiten belegt.

Enzym	Spezifische Aktivität (in mU/mg Protein) der Enzyme von berteriana-Mit.	odorata-Mit.	Irrtumswahrscheinlichkeit
NADH-Cytochrom-c-Reduktase	18,07± 2,71	25,44± 2,65	p = 0,001
Succinat-Cytochrom-c-Reduktase	10,83± 2,45	15,97± 2,93	p = 0,004
Cytochrom-c-Oxidase	10,23± 3,32	14,90± 2,84	p = 0,004
NADH-Oxidase	343,1 ±22,6	424,3 ±35,4	p = 0,047
Malat-Dehydrogenase	282,4 ±27,0	305,3 ±31,7	p = 0,096
Succinat-Dehydrogenase	150,2 ±15,3	185,5 ±24,3	p = 0,047

Tab. 8 : Vergleich der spezifischen Aktivitäten (bezogen auf Mitochondrien-Gesamtprotein) einiger mitochondrialer Enzyme des Oenotheren-Bastardpaars lv (angegeben sind der Mittelwert, der mittlere Fehler des Mittelwerts und die Irrtumswahrscheinlichkeit p).

Die unter anderem z.B. von MOREAU und LANCE 1972, DOUCE et al. 1973, DAY und WISKICH 1975 und DIZENGREMEL 1977 veröffentlichten Enzymaktivitäten anderer pflanzlicher Mitochondrien stimmen mit den gemessenen relativ gut überein.

[x] Ein Teil dieser Versuche wurde von OTTMAR (1979) im Rahmen einer Staatsexamensarbeit durchgeführt.

5. ERGEBNISSE

TEIL 3: DIE LIPIDZUSAMMENSETZUNG DER MITOCHONDRIEN UND IHRER MEMBRANEN

Vorbemerkung:

Die Atmungskette der Mitochondrien setzt eine gerichtete (vektorielle) enzymkatalysierte Reaktionsfolge voraus. Diese komplizierte Organisationsform wird dadurch erreicht, dass die einzelnen Enzyme in einer definierten Anordnung membrangebunden sind.
Die räumliche Struktur der Membranen wird dagegen durch ihren Lipidanteil gewährleistet, der sich neben wenigen neutralen Lipiden fast ausschliesslich aus polaren Lipiden zusammensetzt.
Diese haben amphiphatischen Charakter, so dass sie sich in wässrigem Millieu spontan zu einer Doppelschicht ordnen, die eine Konfiguration minimalen Energiegehaltes und zugleich die Grundstruktur aller biologischen Membranen darstellt (vgl. LODISH und ROTHMAN 1979).

Den Hauptanteil der polaren Lipide stellen die Phospholipide, die bisher nur aus Membranen isoliert wurden (KARLSON 1977,HARRISON und LUNT 1977). Bei mitochondrialen Membranen machen sie annähernd 90% aller Lipide aus (BOSCHETTI 1978, CZIHAK et al. 1978, HARMON et al. 1974).

Wie sehr die Proteine mit den Phospholipiden in der Membran assoziiert sein können, zeigt sich nach der Isolierung der mitochondrialen Multienzymkomplexe (Komplexe I-IV): Sie weisen, so lange sie enzymatische Funktion zeigen, immer noch einen erheblichen Phospholipidbestandteil auf (HAFETI et al. 1976). Ebenso werden die Aktivitäten beispielsweise der Cytochrom-c-Oxidase und der NADH-Dehydrogenase durch die jeweilige spezifische Cardiolipin-Anordnung beeinflusst (HARMON et al. 1974, AWASTHI et al. 1970).
Auch werden zahlreiche Aktivitätsunterschiede und Resistenz-Phänomene einiger Enzyme während der Organellen-Biogenese den umgebenden Phospholipid-Modifikationen zugeschrieben (NAKAMURA und ASAHI 1976, WARING et al. 1976, MÜLLER und SANTARIUS 1978 -bei Chloroplasten-, DOGRAS et al. 1977. DONALDSON und BEEVERS 1977, KANE et al. 1978, COMTE et al. 1976).

Da zudem Mitochondrien zumindest teilweise eine eigene Phospholipidsynthese aufweisen, sollen die beiden Mitochondrientypen sowohl hinsichtlich ihres Phospholipidaufbaus als auch der Fettsäurenzusammensetzung der Phospholipidklassen vergleichend untersucht werden.

5.1. Analyse der Phospholipide

Zuerst werden die Phospholipide von den übrigen Lipidklassen nach 2.10.1. durch eine eindimensionale Dünnschichtchromatographie getrennt. Dies veranschaulicht Abbildung 16:

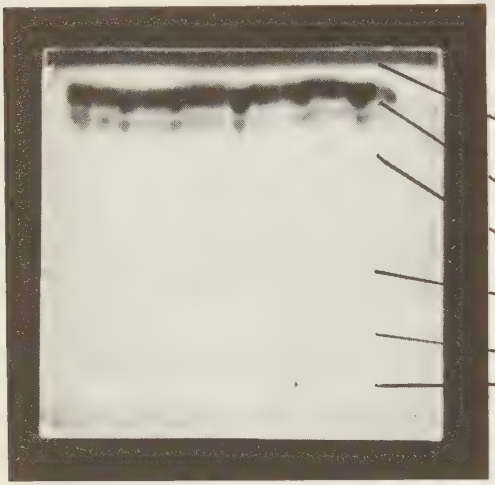


Abb. 16 : Auftrennung des Gesamtlipidextraktes der gereinigten odorata-Mitochondriensuspension in die verschiedenen Lipidklassen durch Fliessmittel A (Aceton - Essigsäure - Wasser = 100: 2 : 1).
Da die Phospholipide zur Weiterverwendung herausgekratzt werden mussten, konnte nur ein kleiner Rest der Phospholipidbande durch Blaufärbung nach Besprühen mit einer Molybdat-Lösung (s. 2.10.3.1.) sichtbar gemacht werden.

Die so gereinigten Phospholipide werden nun mit Hilfe einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie nach 2.10.2. in die individuellen Phospholipidklassen separiert, wobei die verwendeten Fliessmittel eine sehr gute Auftrennung ergeben (Abb. 17).

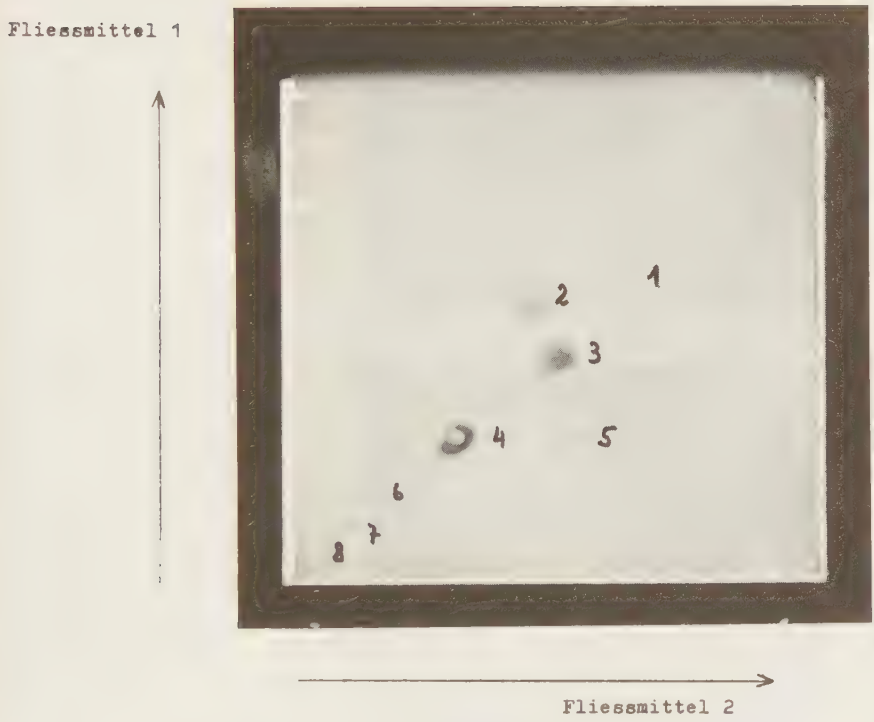
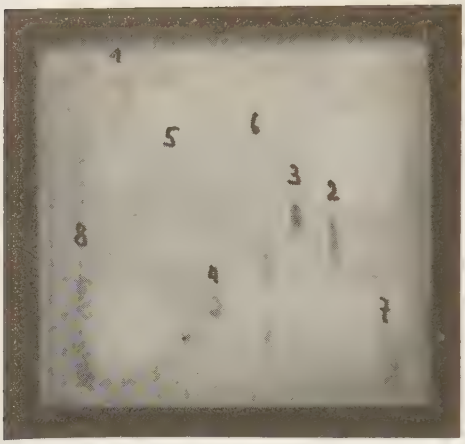


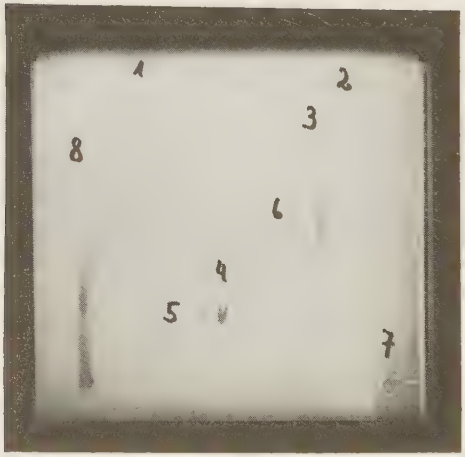
Abb.17 : Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm des Phospholipidextraktes einer gereinigten Mitochondriensuspension, isoliert aus grünen Blättern des Oe- Bastards lv mit odorata-Mitochondrien.
(Fliessmittel 1: Chloroform - Methanol - 25% Ammoniak = 60 : 40 : 5)
(Fliessmittel 2: Chloroform - Methanol - Eisessig - Wasser = 85 : 15 : 10 : 3)
(1=CL, 2=PG, 3=PE, 4=PC, 5=PA, 6=PS, 7=PI, 8= Startfleck).

Die Identifizierung der Chromatogrammflecke erfolgt über die RF-Werte der Referenzsubstanzen, die jeweils eindimensional in den beiden Fliessmitteln entwickelt werden (Abb.18 und Abb. 19).Eindeutig bestimmt wurden aus den gereinigten Mitochondriensuspensionen des Bastardpaars lv unabhängig vom Plasmon die Phospholipide CL, PG, PC, PE, PA, PS und PI. Die quantitative Zusammensetzung jedoch weist erhebliche Differenzen auf (s.Tab. 9).



Rf-Werte der Referenzlipide

1 (CL) : 81
2 (PG) : 72
3 (PE) : 54
4 (PC) : 21
5 (PA) : 11
6 (PS) : 15,(35)
7 (PI) : 3
8 (BE) : 3,15,(55)



Rf-Werte der Referenzlipide

1 (CL) : 96
2 (PG) : 47
3 (PE) : 56
4 (PC) : 26
5 (PA) : 69
6 (PS) : (17),40,(69)
7 (PI) : 6
8 (BE) : 6,37,(56)

Abb. 18 und 19: Eindimensionale Dünnschichtchromatogramme der Referenzsubstanzen

Abb. 18: entwickelt in Lösungsmittel 1 (Chloroform - Methanol - 25% Ammoniak = 60 : 40 : 5)

Abb. 19 : entwickelt in Lösungsmittel 2 (Chloroform - Methanol - Eisessig - Wasser = 85 : 15 : 10 : 3)
(BE = Mischung aus PS und PI; 6 und 8 verunreinigt).

5.2. Vergleich der beiden Mitochondrientypen hinsichtlich ihrer Phospholipid-Zusammensetzung

Die quantitative Abschätzung der Phospholipide wird durch die optische Bestimmung des anorganischen Phosphatgehaltes nach 2.10.4. durchgeführt. Anschliessend werden die beiden Mitochondrientypen in ihrer Phospholipid-Zusammensetzung verglichen. (Tab. 9).

Phospho-lipid	berteriana Mitochondrien		odorata Mitochondrien	
	µMol Lipid-P	in % des Gesamtgehalts	µMol Lipid-P	in % des Gesamtgehalts
PC	0,294±0,086	38	0,224±0,079	37
PE	0,263±0,041	34	0,194±0,036	32
CL	0,077±0,007	10	0,102±0,033	17
PG	0,070±0,008	9	0,025±0,009	4
PI	0,040±0,005	5	0,036±0,012	6
PS	0,015±0,001	2	0,018±0,004	3
PA	0,015±0,002	2	0,006±0,001	1
Total	0,773	100	0,605	100

Tab. 9 : Vergleich der Phospholipid-Zusammensetzung der beiden Mitochondrientypen des Oe.-Bastardpaars lv. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf je 6 Versuche, wobei der P_i-Gehalt über die Eichkurve Abb. 7 bestimmt wird.

Wie die Tabelle 9 zeigt, machen Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidyläthanolamin (PE) etwa 70% des gesamten Phospholipidgehalts aus, während Phosphatidylinosit (PI), Phosphatidylglycerin, (PG), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidsäure (PA) zusammen nur 15% einnehmen. Denselben Anteil weist dagegen das für Mitochondrien charakteristische Cardiolipin (Diphosphatidylglycerin =CL) allein auf.

DOUCE et al. (1968) BEN ABDELKADER und MAZLIAK (1970),McCARTY et al. (1973), SCHWERTNER und BIALE (1973), MOREAU et al. (1974) und MANNELLA und BONNER, Jr. (1975) finden ähnliche Zusammensetzungen auch bei anderen pflanzlichen Mitochondrien.

Vergleicht man nun die beiden Mitochondrientypen untereinander, so fällt auf, dass bei ihnen PC, PE, PI, PS und PA ähnlich verteilt sind, während odorata-Mitochondrien einen 70% höheren Cardiolipin und einen um 55% niedrigeren Phosphatidylglyceringehalt aufweisen.
Ausserdem zeichnen sich berteriana-Mitochondrien durch einen um knapp 30% höheren P_i-Gesamtgehalt aus.

Da das durchschnittliche Molekulargewicht der Phospholipide etwa 780 beträgt (s. SCHWERTNER und BIALE, 1973) und die Mitochondriensuspension vor der Lipidextraktion etwa 2 mg Protein enthält, kann in grober Annäherung der Phospholipidanteil im Verhältnis zum Proteinanteil angegeben werden (Tab. 10):

	$\frac{\mu g \text{ Phospholipid}}{mg \text{ Protein}}$	Prozent Phospholipid
berteriana-Mit.	301	23%
odorata-Mit.	236	19%

Tab. 10: Vergleich des Phospholipid-Gehalts zum Proteingehalt. Die Prozentangabe bezieht sich auf $\frac{mg \text{ Phospholipid}}{mg \text{ Phospholipid} + mg \text{ Protein}} \times 100$

Die berteriana-Mitochondrien bauen demnach eine grössere Menge Phospholipide in ihre Membranen ein als die odorata Mitochondrien.

5.3. Die Phospholipid-Zusammensetzung der äusseren und inneren Membranen bei odorata und berteriana Mitochondrien

Aus der von der Endosymbiontentheorie abgeleiteten Hypothese (s. Einleitung), dass nur die innere Mitochondrienmembran von der mt-DNA mitcodiert wird, während die äussere Membran cytoplasmatischen Ursprungs, also ausschliesslich kerncodiert ist, und der Tatsache, dass die untersuchten Mitochondrien aus Pflanzen isoliert werden, die zwar verschiedenes Plasmon aufweisen, dafür aber genomgleich sind, ergeben sich für die Phospholipid-Zusammensetzung der Membranen folgende Konsequenzen:

1. Die äusseren Membranen sollten annähernd dieselbe Phospholipid-Zusammensetzung zeigen.

2. Die oben (s. 5.3.) berichteten Differenzen im Phospholipid-Proteinverhältnis und in der Phospholipid-Zusammensetzung müssten auf die inneren Membranen beschränkt bleiben.

Unter diesem Aspekt erfolgt die Bestimmung der Phospholipid-Zusammensetzung der mitochondrialen Membranfraktionen.

Dazu wird nach der unter 2.5. beschriebenen Methode von DAY und WISKICH (1975) die äussere Mitochondrienmembran durch Detergenzbehandlung abgelöst und ebenso wie die Mitoplastenfraktion (innere Membran und Matrix) durch verschiedene Zentrifugationsgeschwindigkeiten sedimentiert.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen die folgenden Tabellen, wobei jedoch einschränkend gesagt werden muss, dass nur jeweils 3 Vergleichsmessungen zur Verfügung standen.

Phospho-lipid	berteriana Mitoplasten (=innere mt-Membran u.Matrix) µMol Lipid-P	in % des Ge-samtgehalts	odorata Mitoplasten µMol Lipid-P	in % des Ge-samtgehalts
PC	0,143±0,024	35	0,106±0,035	32
PE	0,130±0,03	32	0,095±0,027	29
CL	0,061±0,008	15	0,076±0,01	23
PC	0,037±0,009	9	0,016±0,006	5
PI	0,020±0,005	5	0,023±0,008	7
PS	0,008±0,001	2	0,010±0,002	3
PA	0,008±0,001	2	0,004±0,002	1
Total	0,407	100	0,330	100

Tab. 11: Vergleich der Phospholipid-Zusammensetzung der Mitoplasten des Oe.-Bastardpaars lv (Mittelwert und Standardabweichung aus je 3 Versuchen).

Die Phospholipid-Zusammensetzung der Mitoplasten ist praktisch mit der der ganzen Mitochondrien identisch, wobei lediglich der Anteil des Cardiolipin zu Ungunsten von Phosphatidylcholin und Phosphatidyl-äthanolamin erhöht ist. Aber auch bei Mitoplasten weist der odorata Typ einen höheren Cardiolipingehalt, der berteriana Typ dagegen einen höheren Phosphatidylglycerinanteil auf. Ebenso ist bei diesem Typ wiederum der Gesamtgehalt etwas höher.

Das Phospholipid-Protein-Verhältnis ist in der nächsten Tabelle angegeben, wobei die Mitoplastenfraktionen etwa je 1 mg Protein enthalten.

	ug Phospholipid/mg Protein	Prozent Phospholipid
berteriana-Mitoplasten	0,407	29%
odorata-Mitoplasten	0,330	25%

Tab. 12 : Vergleich des Phospholipid-Gehalts zum Proteingehalt bei Mitoplasten. Die Prozentangaben beziehen sich auf

$$\frac{\text{mg Phospholipid}}{\text{mg Phospholipid + mg Protein}} \times 100$$

Bei berteriana-Mitochondrien sind demnach am Aufbau der inneren Membran zu 29% Phospholipide und zu 71% Proteine beteiligt, während die innere Membran der odorata-Mitochondrien nur zu 25% aus Phospholipiden besteht. Die tatsächlichen Werte liegen sicher noch etwas höher - etwa um 20% -, da ausser den Membranproteinen auch die in der Matrix gelösten Proteine bei der Bestimmung mit erfasst werden.
Die Phospholipid-Zusammensetzung der äusseren Membranen ist in Tabelle 13 widergegeben:

Phospholipid	äussere Membran d. bert.-Mit.		äussere Membran d. od.-Mit.	
	uMol Lipid-P	in % d. Gesamtgehalts	uMol Lipid-P	in % d. Gesamtgehalts
PC	0,025±0,007	54	0,025±0,004	55,5
PE	0,021±0,013	46	0,020±0,014	44,5
Total	0,046	100	0,045	100

Tab. 13: Vergleich der Phospholipid-Zusammensetzung der äusseren Membranen des Oe.-Bastardpaars (Mittelwert und Standardabweichung aus je 3 Versuchen).

Die äusseren Membranen scheinen nur aus Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin aufgebaut zu sein, also genau aus den Phospholipiden, die nach DOUCE et al. (1972) nicht von den Mitochondrien selbst de novo synthetisiert werden können. Dies entspricht auch den Ergebnissen von McCARTY et al. (1973). Auch kann dieser Befund den etwas erniedrigten Phosphatidylcholin- und -äthanolamin-Anteil bei den Mitoplasten gegenüber den ganzen Mitochondrien erklären.

Andererseits muss ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass die äusseren Membranfraktionen nur ca. 50 ug Protein enthalten und dementsprechend wenig Lipide, so dass die anderen Phospholipide unter Umständen nicht nachweisbar sind. Beachtenswert erscheint aber, dass die äusseren Membranen der beiden Mitochondrientypen weder in der Phospholipidverteilung noch im Lipid-P-Gesamtgehalt nennenswerte Unterschiede aufweisen. Dies bestätigen auch die errechneten Phospholipid-Protein-Relationen (Tab. 14):

	ug Phospholipid/ mg Protein	Prozent Phospholipid
äussere Membranen d.bert.-Mit.	0,920	48
äussere Membranen d.od.-Mit.	0,900	47

Tab. 14: Vergleich des Phospholipid-Gehalts zum Proteingehalt der äusseren Membranen von Mitochondrien aus Blättern des Oe.-Bastardpaars lv.

Die äusseren Membranen sind im Gegensatz zu den inneren Membranen fast zur Hälfte aus Phospholipiden aufgebaut, wobei dieser Prozentsatz vom Mitochondrientyp völlig unabhängig zu sein scheint.

5.4. Die Analyse der Fettsäuren

Die Fettsäuren der Phospholipide werden durch direkte Transesterfikation nach 2.11.1. in ihre Methylester überführt. Diese werden dann gaschromatographisch nach 2.11.1. analysiert. Die folgende Abbildung 20 zeigt ein Gaschromatogramm von Phosphatidyläthanolamin der gereinigten Mitochondriensuspension des Oe.-Bastards 1v mit odorata Plasmon.

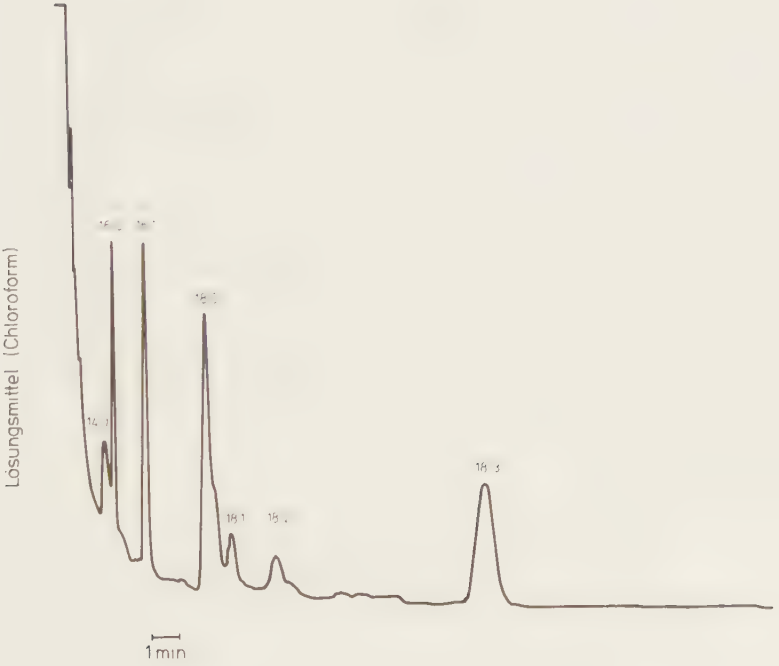


Abb. 20: Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester von PE der gereinigten Mitochondriensuspension des Oe.-Bastards 1v mit od.Plasmon.Nach dem Lösungsmittelpeak folgen die Fettsäuren: Myristinsäure (14:0), Palmitinsäure (16:0), Palmitoleinsäure (16:1), Stearinsäure (18:0), Ölsäure (18:1), Linolsäure (18:2), Linolensäure (18:3). Die kleineren Peaks werden nicht berücksichtigt (weniger als 1% der Gesamtmenge).

5.5. Vergleich der Fettsäuren-Zusammensetzung der mitochondrialen Phospholipide

Wie gezeigt, weisen die beiden Mitochondrientypen erhebliche Differenzen in ihrer Phospholipid-Zusammensetzung auf. Daher wird vermutet, dass sich der mt-DNA-Einfluss auch in der Fettsäuren-Zusammensetzung der mitochondrialen Phospholipide manifestieren könnte. In der Tabelle 15 auf der nächsten Seite werden deshalb sowohl die Fettsäuren-Muster der einzelnen Phospholipide untereinander verglichen, als auch die beiden Mitochondrientypen pro Lipid gegenüber gestellt.

Betrachtet man die wichtigsten Phospholipide Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin, so fällt die etwa gleiche prozentuale Verteilung der Fettsäuren auf, wobei die berteriana-Mitochondrien praktisch dieselben Werte aufweisen wie die odorata-Mitochondrien. Auch das Verhältnis ungesättigte zu gesättigte Fettsäuren ist etwa gleich: Beide Lipide enthalten unabhängig vom Cytoplasmon einen etwas höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren.

Im Gegensatz dazu weisen die nur in geringem Umfang am Membranaufbau beteiligten Lipide Phosphatidylinosit,Phosphatidylserin und die Phosphatidsäure zu Ungunsten der ungesättigten Fettsäuren einen erheblich höheren Grad an gesättigten Fettsäuren auf, wobei odorata-Mitochondrien immer etwas mehr ungesättigte Fettsäuren enthalten. Diese Tendenz ist bei Phosphatidsäure am deutlichsten ausgeprägt.

		Fettsäuren-Anteil in % am Gesamtgehalt bei ganzen Mitochondrien							
Phospholipid	Mit.-Typ	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	ungesättigte Fettsäuren / gesättigte
PC	bert.	1	27	1	17	3	19	31	1.20
	od.	1	32	1	13	4	16	32	1.15
PE	bert.	3	24	1	16	2	25	27	1.28
	od.	4	26	2	12	3	21	30	1.33
CL	bert.	-	16	1	13	10	22	38	2.45
	od.	-	12	7	5	13	14	49	4.88
PG	bert.	9	24	6	14	6	15	25	1.11
	od.	7	18	3	8	7	27	29	2.00
PI	bert.	8	40	-	31	3	8	10	0,27
	od.	6	34	2	33	8	12	5	0,37
PS	bert.	6	34	-	36	4	9	16	0,38
	od.	8	36	-	24	4	9	18	0,46
PA	bert.	6	32	2	28	2	11	16	0,47
	od.	5	35	-	18	8	14	19	0,71

Tab. 15 : Die Fettsäuren-Zusammensetzung der Phospholipide bei odorata bzw. berteriana Mitochondrien. (Die fehlenden Prozente entfallen auf weitere Fettsäuren, die jedoch weniger als 1% aufweisen. Die Werte wurde der Übersichtlichkeit wegen auf ganze Zahlen gerundet.
Aus dem gleichen Grund wurde auf die Angabe der Standardabweichung verzichtet. Es wurden je 6 Versuche durchgeführt.)

Eine dramatische Veränderung in der Fettsäuren-Zusammensetzung tritt bei den beiden Phosphatidylglycerinen auf: Das Cardiolipin der berteriana-Mitochondrien weist die 2,5-fache Menge an ungesättigten Fettsäuren auf; dieser Wert steigt bei odorata-Mitochondrien gar auf das 5-fache an! Also auch im direkten Vergleich der beiden Lipide enthält das Cardiolipin der odorata-Mitochondrien doppelt soviele ungesättigte Fettsäuren.

Die gleiche Aussage kann auch für das Phosphatidylglycerin getroffen werden: Auch hier ist der Anteil der ungesättigten Fettsäuren bei odorata-Mitochondrien doppelt so hoch wie bei berteriana-Mitochondrien. Allerdings besteht das Phosphatidylglycerin der berteriana-Mitochondrien nur zu etwas mehr als der Hälfte aus ungesättigten Fettsäuren.

5.6. Fettsäurenmuster der beiden Mitochondrientypen bzw. der äusseren und inneren Membranen

Im Anschluss daran wird das Fettsäurenmuster eines Phospholipid-Gesamtextrakts der Mitochondriensuspensionen vergleichend untersucht:

Fettsäure	Anteil in % aller Fettsäuren bei berteriana-Mit.	odorata-Mit.
14:0	5,5±0,7	4,3±0,8
16:0	28,3±2,2	25,1±1,9
16:1	2,4±0,4	2,9±0,3
18:0	19,8±3,25	14,8±2,1
18:1	4,3±1,53	6,9±0,5
18:2	16,3±2,7	17,2±1,9
18:3	22,0±0,8	26,5±3,2
ungesättigte FS / gesättigte FS	0,84	1,21

Tab. 16: Vergleich der Fettsäurenmuster zwischen berteriana- und odorata-Mitochondrien. (Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 6 Versuchen; die fehlenden 1,4% bzw. 2,3% entfallen auf Fettsäuren, die jeweils weniger als 1% am Gesamtgehalt ausmachen.)

Aus Tabelle 16 ist ersichtlich, dass berteriana-Mitochondrien im direkten Vergleich immer einen etwas höheren Anteil an gesättigten Fettsäuren aufweisen (14:0, 16:0, 18:0), während odorata-Mitochondrien mehr ungesättigte Fettsäuren enthalten (16:1, 18:1, 18:2, 18:3). Dies kommt auch in der Relation ungesättigte zu gesättigte Fettsäuren zum Ausdruck: Die Phospholipide der berteriana-Mitochondrien sind zu etwas mehr als 50% aus gesättigten Fettsäuren aufgebaut, die odorata-Mitochondrien dagegen enthalten bedeutend mehr ungesättigte Fettsäuren.

Berücksichtigt man dabei die Fettsäurenmuster der Einzellipide (s.Tab.15), so kann festgestellt werden, dass der höhere Anteil an ungesättigten Fettsäuren im Phospholipid-Gesamtextrakt der odorata-Mitochondrien fast ausschliesslich auf die Fettsäuren-Verteilung des Cardiolipins und des Phosphatidylglycerins zurückzuführen ist.

Die Analyse der Fettsäuren-Zusammensetzung des Phospholipid-Gesamtextrakts der inneren Membranen bzw. der Mitoplasten zeigt Tabelle 17:

Fettsäure	Anteil in % am Gesamtgehalt der inneren Membranen von	
	berteriana-Mit.	odorata-Mit.
14:0	4,3±1,53	4,3±2
16:0	23,3±5,8	18,3±2,9
16:1	3 ±1	7,7±2,9
18:0	16,7±2,9	11,7±2,9
18:1	8 ±2,6	10,7±2,5
18:2	19 ±5,3	18,3±2,9
18:3	25 ±5	29 ±3,6
ungesättigte FS / gesättigte FS	1,24	1,92

Tab. 17: Vergleich der Fettsäurenmuster von Mitoplasten der beiden Mitochondrientypen. (Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 3 Versuchen.)

Im Vergleich zu den ganzen Mitochondrien (Tab. 16) weisen die inneren Membranen (Tab. 17) einen höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren auf.

Dabei ist der Quotient aus ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren bei odorata-Mitochondrien wiederum um etwa 50% höher als bei berteriana-Mitochondrien.

Abschliessend werden die Fettsäurenmuster der äusseren Mitochondrienmembranen verglichen (Phospholipid-Gesamtextrakte, s. Tab. 18):

Fettsäure	Anteil in % am Gesamtgehalt der äusseren Membranen von	
	berteriana-Mit.	odorata-Mit.
14:0	11,7±2,9	10,7±2,5
16:0	31,7±2,9	30,3±4,0
16:1	-	-
18:0	26,7±1,5	27,7±2,5
18:1	6,7±2,9	6,6±2,9
18:2	7,3±2,5	8,0±2,7
18:3	15,0±5,0	16,7±2,9
ungesättigte FS / gesättigte FS	0,41	0,46

Tab. 18 : Vergleich der Fettsäurenmuster der äusseren Membranen der beiden Mitochondrientypen. (Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 3 Versuchen.)

Es ist ganz offensichtlich, dass die Phospholipide der äusseren Membranen einen viel grösseren Anteil an gesättigten Fettsäuren aufweisen: Sie sind zu etwa 70% aus gesättigten Fettsäuren aufgebaut, während die inneren Membranen lediglich etwa 40% gesättigte Fettsäuren enthalten.

Bemerkenswert wiederum erscheint die Tatsache, dass die äuseren Membranen fast identisch aufgebaut sind. Deshalb sind natürlich auch die Quotienten der ungesättigten zu den gesättigten Fettsäuren gleich (Tab. 18).

Dies scheint eine weitere Bestätigung für die eingangs formulierte Hypothese zu sein, dass die am Aufbau der äusseren Mitochondrienmembran beteiligten Enzyme ausschliesslich von der Kern-DNA codiert werden, und dass sich der Einfluss der mt-DNA über die mitochondrieneigene Proteinsynthese lediglich in den anderen mitochondrialen Kompartimenten (innere Membran, Matrix und eventuell "intermembrane space") manifestieren kann.

6. DISKUSSION

Obwohl Mitochondrien aus Oenotherenformen mit verschiedenen Chromosomensätzen (1v und vI) isoliert werden, weisen odorata-Mitochondrien gegenüber berteriana-Mitochondrien beim gleichen Genom immer eine höhere Atmungsaktivität auf. Auch die spezifischen Aktivitäten der untersuchten mitochondrialen Enzyme liegen bei odorata-Mitochondrien generell höher. Selbst die aus Kallusgewebe der Elternform Oenothera berteriana (Genom B1) isolierten Mitochondrien zeigen eine nur für berteriana-Mitochondrien charakteristische Atmungsaktivität. Dies belegt den gerichteten und konstanten Einfluss der mt-DNA auf die Atmungsaktivität in Abhängigkeit vom Mitochondrientyp und macht zudem die genetische Selbständigkeit der Mitochondrien deutlich.

Auch die Versuche zur Phospholipid- und Fettsäuren-Zusammensetzung der mitochondrialen Membranen unterstreichen die Teilautonomie der Mitochondrien: Die inneren Membranen weisen - wiederum in Abhängigkeit vom Mitochondrientyp - unterschiedliche Phospholipid- und Fettsäurenmuster auf. Die äusseren Membranen dagegen sind - unabhängig von der mt-DNA - bei dem untersuchten genomgleichen Bastardpaar hinsichtlich ihrer Phospholipid- und Fettsäuren-Zusammensetzung identisch aufgebaut, so dass angenommen werden muss, dass lediglich die innere Membran von der mt-DNA mitcodiert wird, während die äussere Membran ausschliesslich kerncodiert zu sein scheint.

Wie eingangs formuliert, erhärten diese Befunde in eindrucksvoller Weise die Endosymbiontentheorie, wobei sich auch hier die cytogenetische Sonderstellung der Oenotheren als Vorteil erweist: Nur mit Organismen, die sich wie die Oenotheren in erbkonstanten reinen Linien bekannter genetischer Konstitution kultivieren lassen, und die bei gleichem Genom verschiedene Mitochondrientypen aufweisen, können Ergebnisse in der vorliegenden Form erzielt werden.

Da die aufgeführten Unterschiede zwischen den beiden Mitochondrientypen den gerichteten Einfluss der mt-DNA beweisen, müsste auch die mt-DNA selbst in Abhängigkeit vom Mitochondrientyp Differenzen in der Basenzusammensetzung zeigen. So konnte BRENNICKE (1979) durch vergleichende physikochemische Analysen mit Restriktionsenzymen unterschiedliche DNA-Fragmente zwischen berteriana-Mitochondrien und odorata-Mitochondrien inzwischen nachweisen. Hierbei wurden die Mitochondrien aus Gewebekulturen der Oenothera berteriana und der genomgleichen Form mit odorata-Mitochondrien isoliert.

Da die meisten der untersuchten Enzyme ebenso wie die Phospholipide und ihre Fettsäuren an der Zusammensetzung der mitochondrialen Membranen beteiligt sind, soll im folgenden der Einfluss der mt-DNA über die mitochondriale Proteinsynthese auf den Membranaufbau diskutiert werden.

6.1. Membranmodelle und Mitochondrienmembranen

Die Berechnung der Phospholipid-Protein-Relationen zeigt, dass die äussere Membran zu knapp 50%, die innere nur zu etwa 25-30% aus Phospholipiden aufgebaut sind. Diese Zahlen spiegeln natürlich nur einen Massenvergleich wider: Wegen der erheblich höheren Molekulargewichte der Proteine (z.B. 340000 für die F_1-ATPase, TZAGOLOFF et al., 1973) ist es evident, dass in die Membranen bedeutend mehr Phospholipid-Moleküle als Proteine eingebaut sind. Das in Anlehnung an erste elektronenmikroskopische Aufnahmen von DANIELLI und DAVSON (1935) entworfene Membranmodell nimmt eine starre Phospholipid-Doppelschicht an, in der die apolaren Fettsäurenketten gegeneinander gerichtet sind. An die polaren Aussenseiten sind dagegen die Proteine angelagert, die die Verbindung zum umgebenden wässrigen Milieu herstellen (s. Abb. 21).

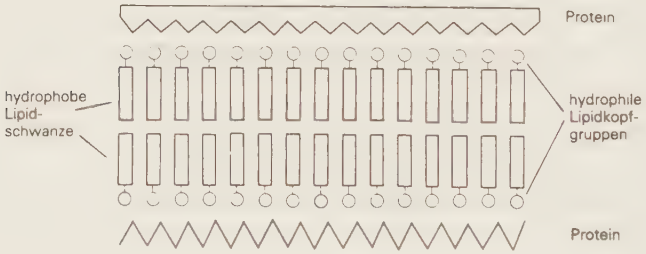


Abb. 21 : Schematische Darstellung des "Danielli-Davson-Modells" (aus HARRISON und LUNT, 1977).

Diese Anordnung bestätigte sich nicht und wurde deshalb verworfen. Zahlreiche Modifikationen führten schliesslich zum "fluid-mosaic-model" von SINGER und NICOLSON 1972,(s. Abb. 22): Die beiden Phospholipid-Schichten verhalten sich bei physiologischen Temperaturen wie eine sehr viskose Flüssigkeit, in die die Proteine entweder nur angelagert oder integriert sind, wobei sie die Doppelschicht als Tunnelproteine durchdringen können. Die integralen Proteine sind dabei in der Lipidschicht relativ frei beweglich, so dass sie untereinander in Kontakt treten können. Aber sie sind keine sog. Strukturproteine, denn die Struktur der Membran wird allein von der Lipidschicht aufrecht erhalten.

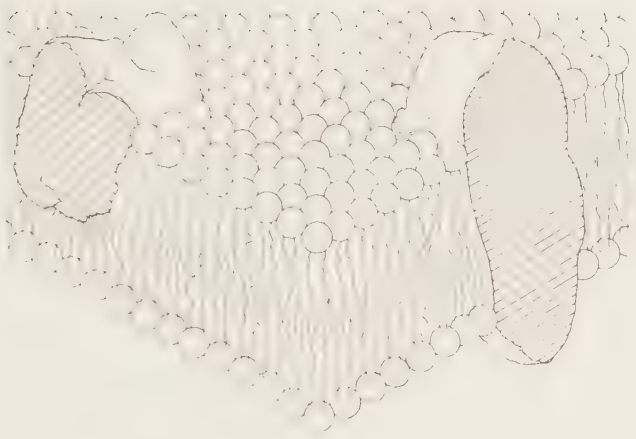


Abb. 22 : Das "fluid-mosaic-model" von Singer und Nicolson (aus SINGER und NICOLSON, 1972).

Dieses "Flüssige Mosaik" steht im Einklang mit den wichtigsten biochemischen Funktionen der Membranen (Permeabilitätsbarriere, selektiver Transport, Absorptionsmatrix für Proteine) und besitzt beispielsweise für die äussere Mitochondrienmembran durchaus Modellcharakter.

Um jedoch die viel komplizierteren physiologischen Leistungen der inneren Membran erklären zu können, sind weitere Modifikationen notwendig. So werden innerhalb der Lipid-bilayer zusätzliche hydrophile Proteinregionen gefordert, so dass man für die innere mitochondriale Membran wenigstens abschnittsweise drei Protein- und vier Lipidschichten postuliert (HARMON et al., 1974).

Eine neuere Modellvorstellung der inneren Membran (HINKLE und McCARTY,1978), die allerdings nur die Anordnung der Proteine im Zusammenhang mit der oxidativen Phosphorylierung berücksichtigt, dafür aber die Phospholipidanordnung und weitere Proteine vereinfachend ausser Acht lässt, zeigt die Abbildung 23.

Die nachgewiesenen, offensichtlich von der mt-DNA abhängigen, Differenzen in den Aktivitäten einiger mitochondrialer Enzyme, welche von dieser Modellvorstellung betroffen sind, sollen im folgenden diskutiert werden.

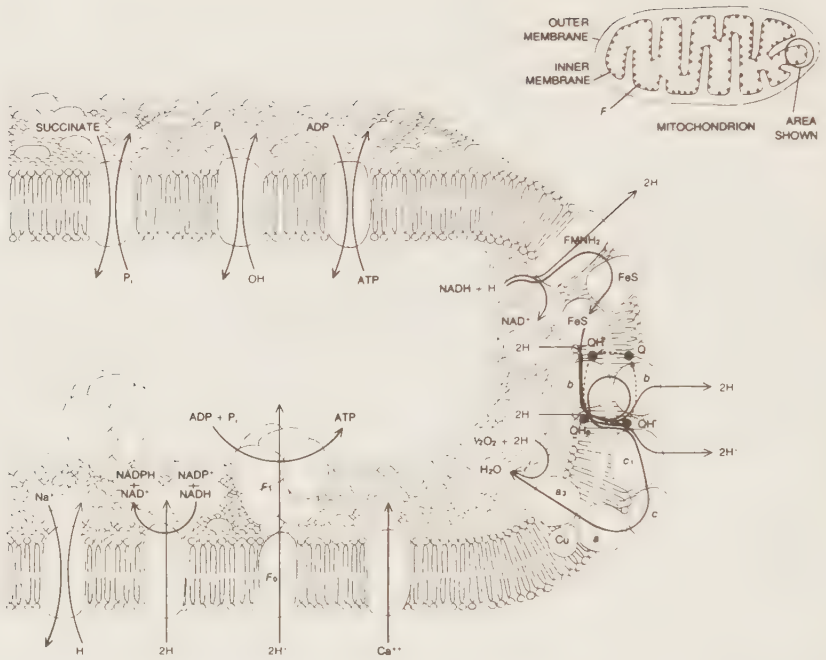


Abb. 23 : Die Enzymanordnung der oxidativen Phosphorylierung in der inneren Mitochondrienmembran (aus HINKLE und McCARTY, 1978).

6.2. Proteine der inneren Membran

Nach SCHATZ und MAISON (1974) sind nur gut 10% der Proteine der inneren Membran vom mitochondrieneigenen genetischen System codiert. Dabei sind alle acht bisher gefundenen Funktionsproteine beim Elektronentransport bzw. der Phosphorylierung beteiligt (so dass beim Ausfall der mitochondrialen Proteinsynthese zwar die Mitochondrienstruktur bestehen bleibt, diese aber biochemisch "tot" ist).
Wegen dieses Einflusses der mt-DNA auf die erwähnten Proteine ist es jetzt verständlich, dass verschiedene Mitochondrientypen bei gleichem Genom Differenzen in den Aktivitäten der Enzymkomplexe aufweisen.

Die genaue Zusammensetzung der Atmungskette aus den Komplexen I-IV zeigt die Abbildung 24, während die weitere Abbildung 25 die mit der Atmungskette gekoppelten möglichen Phosphorylierungsstellen (site I-III) deutlich macht. Ebenso sind die Blockierungsorte der Atmungsgifte angegeben.

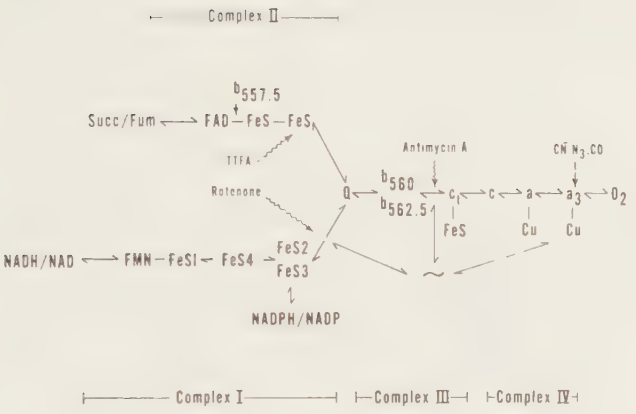


Abb. 24 : Die Enzymkomplexe der Atmungskette (aus TEDESCHI, 1976).

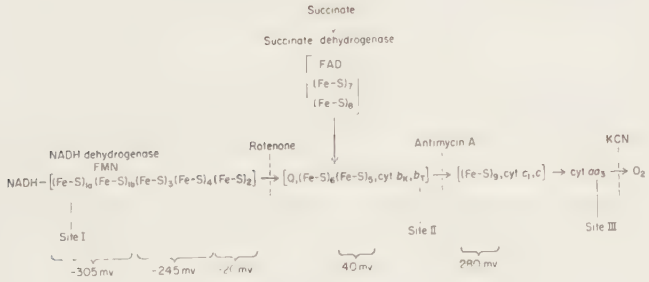


Abb. 25 : Phosphorylierungs- und Blockierungsorte der Atmungskette (aus TEDESCHI, 1976).

Trotz Antimycin-A- und KCN-Vergiftung wiesen alle in dieser Arbeit untersuchten Mitochndriensuspensionen eine Restatmung auf. Dieses Phänomen erklären THEOLOGIS und LATIES (1978) durch eine noch unbekannte Komponente F in Komplex III, die eine sehr geringe Affinität für Antimycin A aufweist, so dass bei Blockierung des normalen Elektronentransports über Cytochrom-b, dieser über F läuft, jedoch kinetisch sehr eingeschränkt ist.

Daher kann bei geringen Antimycin-A-Konzentrationen also noch Substrat oxidiert und ATP phosphoryliert werden (s. Abb. 26).

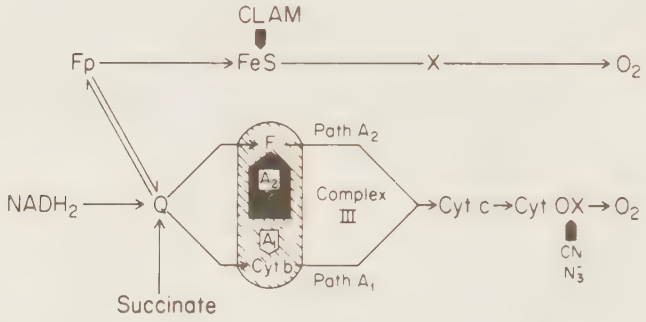


Abb.26: Hypothetische Anordnung von Elektronencarrier in der inneren Membran (aus THEOLOGIS und LATIES, 1978).

Bei höherer Antimycin-A-Konzentration ist, ebenso wie bei KCN-Vergiftung in Komplex IV, der normale Elektronentransport vollständig blockiert. Dennoch wird eine Atmungsrate gemessen: Die Elektronen werden dabei vom Ubiquinon (Q) über ein Flavoprotein (FP) und eine unbekannte Oxidase (X) auf den Sauerstoff übertragen (s. Abb. 26). Allerdings ist dieser Umweg nicht mit einer ATP-Phosphorylierung verknüpft (Übersicht bei SOLOMOS, 1977).
Während sich die beiden Mitochondrientypen hinsichtlich der Wirkungsweise der Atmungsgifte Antimycin A und KCN ähnlich verhalten, tritt bei der NADH-Oxidation eine überraschende Differenz auf: Berteriana-Mitochondrien nutzen nur 2 Phosphorylierungsstellen, odorata-Mitochondrien dagegen alle 3!

Im Gegensatz zu pflanzlichen Mitochondrien sind beispielsweise Säugetiermitochondrien nicht in der Lage, extramitochondriales NADH direkt zu veratmen. Sie nehmen exogenes NADH unter Energieverbrauch über einen "α-glycerophosphat-shuttle" auf, so dass nur noch 2 Mole ATP pro 1 Mol extramitochondrialem NADH synthetisiert werden.

Auch bei den meisten pflanzlichen Mitochondrien wurde ein P/O-Verhältnis von nur 2 ermittelt, doch können diese Mitochondrien das weniger negative exogene NADH direkt in die Atmungskette einschleussen (s. Abb. 27).

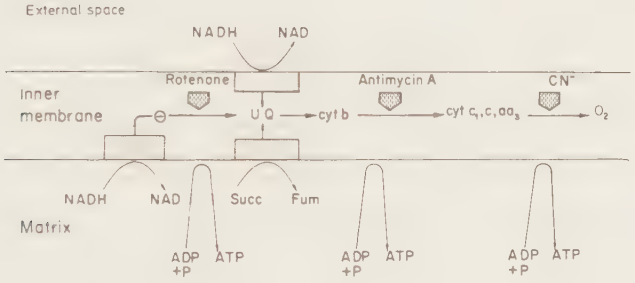


Abb. 27 : Oxidation von exogenem und endogenem NADH durch die Atmungskette (HELDT, 1976).

Dies ist theoretisch durchaus möglich, da auch nach dem Hinkle und McCarty-Modell (s. Abb. 24) Ubiquinon in der Membran wandert, und so die Wasserstoff-Atome des extramitochondrialen, aber weniger negativen NADH direkt übernehmen kann. Über die noch folgenden 2 sites können dann noch 2 Moleküle ATP phosphoryliert werden.

Doch schon 1974 postulieren DAY und WISKICH für Blumenkohlmitochondrien einen weiteren Weg der NADH-Oxidation, der alle 3 sites nutzen kann. Tatsächlich erfüllt der von HELDT (1976) vorgeschlagene "malate-aspertate-shuttle" diese Forderung: Extramitochondriales NADH wird zuerst zur Reduktion von Oxalacetat (OA) zu Malat (Mal) verwendet. Dieses wird durch die Membran in die Matrix transportiert und dort reoxidiert. Das dabei wieder entstehende NADH kann durch die Atmungskette über alle 3 sites hinweg oxidiert werden. Das ebenfalls entstehende Oxalecetat wird zu Glutamat (Glu) transaminiert, wobei α - Ketoglutarat (α KG) und Aspartat (Asp) entstehen. Diese beiden Komponenten werden durch die Membran im Austausch mit Malat und Glutamat nach aussen transportiert. Ebenfalls durch Transaminierung wird aussen Glutamat und Oxalacetat regeneriert (s. Abb. 29).

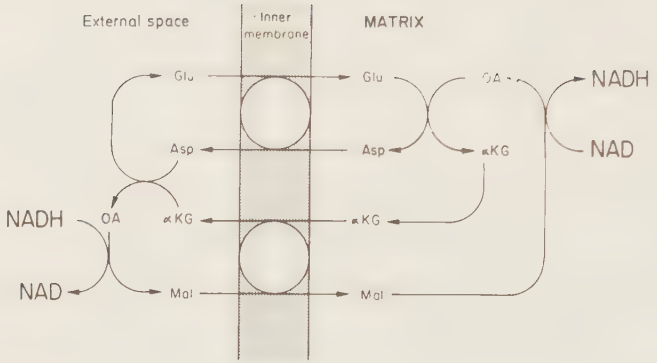


Abb. 28 : Malat-Aspartat-Cyklus (Erklärung im Text).

Es muss also angenommen werden, dass odorata-Mitochondrien in Abhängigkeit von der mt-DNA den Malat-Aspartat-Cyklus, berteriana-Mitochondrien dagegen die direkte Oxidation von NADH bevorzugen! Wie aus Abbildung 27 ersichtlich, müsste die direkte Oxidation von NADH durch berteriana-Mitochondrien gegen Rotenon unempfindlich sein, die odorata-Mitochondrien dagegen müssten eine durch Rotenon hemmbare NADH-Substratatmung aufweisen. Die von PFLUMM (1979) bei demselben Bastardpaar durchgeführten Versuche bestätigen diese Annahme.

Weiter konnte im Ergebnisteil gezeigt werden, dass sowohl die spezifischen Atmungsraten, als auch die untersuchten spezifischen Enzymaktivitäten generell bei odorata-Mitochondrien zwischen ca. 15% und 45% höher liegen. Dieser nachweisbare, gerichtete Einfluss der mt-DNA aus odorata-Mitochondrien lässt drei verschiedene Erklärungsmöglichkeiten zu:

1. Die innere Mitochondrienmembran enthält, bezogen auf den Proteingehalt, mehr Enzyme der oxidativen Phosphorylierung zu Ungunsten anderer Proteine.

2. Die Proteine sind bei beiden Mitochondrientypen gleich verteilt, nur ist die Aktivität der odorata-Enzyme höher (wobei die Aktivitätsdifferenz nur von den Proteinen selbst abhängt.

3. Wiederum sind die Proteine bei beiden Mitochondrientypen gleich verteilt, doch wird die höhere Enzymaktivität der odorata-Mitochondrien durch die umgebende Phospholipidschicht bewirkt.

Trifft der 1. Fall zu, so müssten die Michaeliskonstanten (K_M) der Multienzymkomplexe und Einzelenzyme bei beiden Mitochondrientypen gleich sein. Wegen der spezifischen Lipidumgebung müssten jedoch Differenzen in der Phospholipid-Zusammensetzung zu erwarten sein.

Bei Gültigkeit von Hypothese 2 müssten die umgekehrten Verhältnisse eintreten: Die Michaeliskonstanten der odorata-Enzyme müssten kleiner sein (höhere Affinität zum Substrat), dafür aber sollte bei beiden Mitochondrientypen die Lipidschicht gleich aufgebaut sein.

Soll die 3. Möglichkeit vorgezogen werden, so sollten wiederum die Michaeliskonstanten der odorata-Enzyme kleiner sein, aber auch die Lipidumgebung sollte Differenzen aufweisen, wenn auch nicht in dem bei Hypothese 1 erwarteten Umfang.

Da bisher nur die Michaeliskonstanten der ATPasen des Bastardpaares lv bestimmt werden konnten (BRÜCK 1979, HIRNINGER 1979), diese aber eine zu grosse Streuung aufwiesen, kann keine der aufgestellten Hypothesen über die Michaeliskonstanten zurückgewiesen bzw. bestätigt werden. Andererseits sollte dies durch Heranziehen der erzielten Ergebnisse über die Lipidzusammensetzungen und Protein-Lipid-Relationen möglich sein.

6.3. Lipidstruktur und Protein-Lipid-Assoziationen

Jede biologische Membran zeichnet sich durch eine spezifische Protein- und Lipidassymetrie aus. So sind am Aufbau reiner Abschlussmembranen nur etwa 25% Proteine beteiligt, die aber nicht regelmässig über die Membran verteilt sind (LODISH und ROTHMAN, 1979), während stoffwechselphysiologisch aktive Membranen bis zu 80% Proteine und dementsprechend nur noch 20% Lipide enthalten. Auch der Anteil der polaren Lipide schwankt beträchtlich. In relativ starren Membranen sind nur noch knapp 50% polare Lipide vertreten. Zudem ist die Fettsäuren-Zusammensetzung und vor allem der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren für alle Membranen charakteristisch. Letzteren kommt im Hinblick auf die Enzymaktivität eine erhöhte Bedeutung zu: Je mehr ungesättigte Fettsäuren eine Membran enthält, desto niedriger ist ihre Phasenumwandlungstemperatur, bei der die Hälfte der Lipidmoleküle im geordneten, die anderen im flüssigen Zustand vorliegen (OVERATH und TRÄUBLE, 1973). Unterhalb dieser Temperatur ist beispielweise ein Wachstum von E. Coli nicht mehr möglich (OVERATH et al., 1970). Anders ausgedrückt: Je niedriger diese Temperatur ist, desto günstiger kann die Thermodynamik der Enzymaktivität beeinflusst werden. Auch ist die Membran bei physiologischen Temperaturen "flüssiger", d.h. die Proteine sind leichter in ihr beweglich und können mit anderen Proteinen agieren. Weiter wird durch Doppelbindungen, v.a. in cis-Stellung, der Raumbedarf eines Lipids grösser, d.h. die Lipide stehen weiter auseinander und sind weniger geordnet, so dass insgesamt mehr Proteine pro Membransegment eingebaut werden können.

Daher können aus der Lipidzusammensetzung, dem Anteil der ungesättigten Fettsäuren und der Lipid-Protein-Relation Rückschlüsse auf die Lipid-Protein-Assoziationen in den Membranen gezogen werden.

Die äusseren Membranen sind bei beiden Mitochondrientypen zu fast 50% aus Lipiden aufgebaut und enthalten annähernd doppelt soviele gesättigte Fettsäuren wie ungesättigte. Sie sind daher als typische Abschlussmembranen zu charakterisieren. Der offensichtlich mt-DNA unabhängige und nur kerncodierte Aufbau der äusseren Mitochondrienmembran, erhärtet zudem die Endosymbiontentheorie, wie bereits im Ergebnisteil ausführlich dargestellt.

Auch der Einfluss der mt-DNA auf den Aufbau der inneren Membran, der sich in einem erhöhten Cardiolipin-, einem niedrigeren Phosphatidylglycerin-Anteil, einem geringeren Lipid-Protein-Verhältnis und einem höheren Grad an ungesättigten Fettsäuren bei odorata-Mitochondrien bemerkbar macht, wurde im Ergebnisteil geschildert.

Wie aber kann die mt-DNA den Lipidaufbau und die Fettsäuren-Zusammensetzung derart dramatisch beeinflussen?

Der Biosyntheseweg der Fettsäuren läuft generell über einen Multienzymkomplex (KARLSON, 1977) nach der Lynen-Spirale ab, die auch hinreichend erklärt, warum überwiegend eine Kettenlänge von 16 bzw. 18 C-Atomen produziert wird. Bei der Synthese von ungesättigten Fettsäuren sind zwei zusätzliche Enzyme nötig. Da odorata-Mitochondrien mehr ungesättigte Fettsäuren aufweisen, müssen wiederum entweder mehr dieser Enzyme oder höhere Enzymaktivitäten postuliert werden.

Noch weit anschaulicher lässt sich der Einfluss der mt-DNA auf die Cardiolipin-Syrthese aufzeigen:
Nach WIRTZ et al. (1976) besteht die Biosynthese von Cardiolipin aus drei Einzelreaktionen, wobei die letzte ausschliesslich auf die Mitochondrien beschränkt bleibt (van den BOSCH, 1974):

I	Phosphatidsäure + CTP	⟶	CDP-Diglycerid
II	CDP-Diglycerid + Glycerin-3-Phosphat	⟶	Phosphatidylglycerin (PG)
III	PG + CDP-Diglycerid	⟶	Cardiolipin

Nun ist es leicht erklärbar, warum odorata-Mitochondrien bei höherem Cardiolipinanteil gleichzeitig einen niedrigeren Phosphatidylglycerin-Anteil aufweisen:

Unter der Annahme, dass die ersten beiden Reaktionen kerngesteuert sind, wäre bei beiden Mitochondrientypen der Phosphatidylglycerin-Anteil gleich hoch. Ist aber nun der Cardiolipin-Anteil bei odorata-Mitochondrien erhöht, dann muss zwangsweise der Phosphatidylglycerin-Gehalt erniedrigt sein !
Auch hier kann wieder spekuliert werden, ob entweder mehr Cardiolipin-Synthetasen in die innere Membran eingebaut sind, oder ob die Enzymaktivitäten der Einzelmoleküle erhöht sind und diese vielleicht zusätzlich durch die Lipidumgebung beeinflusst werden.

Abschliessend sollen nun die diskutierten Hypothesen zur Erklärung der enzymatischen Aktivitätsdifferenzen aufgegriffen, an Hand der erzielten Ergebnisse zur Lipidanalyse geprüft und eventuell modifiziert werden.

Da deutliche Unterschiede in der Lipidzusammensetzung auftreten, kann der 2. Fall nicht gelten, nach der bei gleicher Lipidverteilung ausschliesslich die Enzymaktivitäten der odorata-Mitochondrien höher liegen.

Auch die 1. Möglichkeit, die bei identischen spezifischen Affinitäten mehr Enzyme der oxidativen Phosphorylierung zu Ungunsten anderer Proteine fordert, muss verworfen werden, da auch andere Enzymaktivitäten, z.B. die der Cardiolipinsynthetase, deutlich bei odorata-Mitochondrien erhöht sind.

Die Hypothese 3 ist ebenso unzureichend, da zwar die umgebende Lipidschicht Differenzen in der Fettsäuren-Zusammensetzung aufweist, doch ist auch das Protein-Lipid- Verhältnis verschieden, so dass z.B. odorata-Mitochondrien mehr Proteine im Verhältnis zu den Lipiden enthalten, was aber der Hypothese 3 widerspricht.
Doch genau über diesen Widerspruch kann die Hypothese 3 mit der Hypothese 1 folgerichtig in Verbindung gebracht, und ein dualer Wirkungsmechanismus der mt-DNA postuliert werden:

Gesteuert durch den Einfluss der mt-DNA bauen odorata-Mitochondrien mehr Enzyme in ihre innere Membran pro Membransegment ein. (So sind auch die zusätzlich benötigten Enzyme für die erhöhte Produktion von ungesättigten Fettsäuren und von Cardiolipin sowie für den "malate-aspertate-shuttle" erklärt.)
Die ebenso von der mt-DNA mitcodierte Phospholipid- und Fettsäuren-Zusammensetzung der Multienzymkomplexe kann zusätzlich die Enzymaktivitäten gerichtet beeinflussen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Atmungsaktivität isolierter Mitochondrien und die Phospholipid-Zusammensetzung ihrer Membranen wurden bei dem genomgleichen Oenotheren-Bastardpaar lv mit berteriana bzw. odorata Plasmon untersucht. Wegen der erheblichen Kontamination mit Chloroplastenbruchstücken wurden die Mitochondrien-Rohfraktionen über einen isopyknischen 'Ludox' - Gradienten gereinigt. Dabei wiesen sowohl die gereinigten Mitochondriensuspensionen als auch die Rohfraktionen befriedigende Atmungsraten, 'respiratory-controlindices' und P/O-Quotienten auf.

Als Hauptergebnisse sind hervorzuheben:

- Mitochondrien des odorata-Typs zeigen gegenüber berteriana-Mitochondrien deutlich gesteigerte Substratatmungen. (Abb. 10,12, 14) Die Unterschiede liegen vor und nach der Dichtezentrifugation in etwa dergleichen Grössenordnung. (Tab. 7)

- Die spezifischen Aktivitäten der untersuchten mitochondrialen Enzyme (Succinat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase, NADH-Oxidase, Cytochrom-c-Oxidase, Succinat-Cytochrom-c-Reduktase, NADH-Cytochrom-c-Reductase) weisen für odortata-Mitochondrien stets höhere Werte auf als bei den berteriana-Mitochondrien (Tab. 8).

- Aus Kalluskulturen der Oenothera berteriana isolierte Mitochondrien oxidieren die untersuchten Substrate wie berteriana-Mitochondrien aus Blättern des Bastards lv. (Abb. 15)

- Bei der Oxidation von NADH synthetisieren berteriana-Mitochondrien nur 2 Mole, odorata-Mitochondrien dagegen 3 Mole ATP. (Abb. 9,11,13) Als mögliche Erklärung wird eine direkte bzw. indirekte Oxidation von NADH in der Atmungskette diskutiert: während bei bert.Mit. die Wasserstoffatome direkt auf das Ubiquinon der Atmungskette übertragen werden, transportieren od.-Mit. exogenes NADH zuerst über einen "malate-aspertate-shuttle" in die Matrix. Dieses wird dann wie endogenes NADH zu FMN in der Atmungskette oxidiert.

- Obwohl die anderen Phospholipide annähernd gleich bei beiden Mitochondrientypen verteilt sind, weisen odorata-Mitochondrien in ihrer Phospholipid-Zusammensetzung einen höheren Cardiolipin- und einen niedrigeren Phosphatidylglycerin-Anteil auf (Tab. 9).

- Weiter ist bei odorata-Mitochondrien der Quotient ungesättigte zu gesättigte Fettsäuren höher (1,21 zu 0,84), das Lipid-Protein-Verhältnis dagegen geringer (19% zu 23% bei berteriana-Mitochondrien).

- Mitoplasten (innere Membran und Matrix) verhalten sich ähnlich wie ganze Mitochondrien. (Tab. 11, 12, 17)

- Die äusseren Membranen sind unabhängig vom Mitochondrientyp praktisch identisch aufgebaut: Sie bestehen zu fast 50% aus Proteinen und enthalten doppelt soviele gesättigte wie ungesättigte Fettsäuren. Auch konnte nur Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin nachgewiesen werden; d.h. ihnen fehlt das für ganze Mitochondrien charakteristische Cardiolipin. (Tab. 13, 14, 18)

- Der identische Aufbau der äusseren Membranen bei gleichzeitig unterschiedlicher Phospholipid-Zusammensetzung der inneren Membranen der beiden Mitochondrientypen, isoliert aus Oenotheren mit gleicher Genomkonstitution, wird als weitere Erhärtung der Endosymbiontentheorie gewertet.

- Der Einfluss der mt-DNA auf die Enzymaktivitäten, die Phospholipid- und Fettsäuren-Zusammensetzungen der inneren Membranen wird diskutiert und in folgender Hypothese zusammengefasst:

  Gesteuert durch den Einfluss der mt-DNA, bauen odorata-Mitochondrien mehr Proteine (Enzyme) pro Membransegment in ihre innere Membran ein, wobei die ebenso von der mt-DNA mitcodierte Phospholipidumgebung die Enzymaktivitäten zusätzlich beeinflussen kann (Phospholipid-Protein-Assoziationen).

8. LITERATURVERZEICHNIS

ACKMAN, R.G. (1969): Gas-liquid chromatography of fatty acids an esters. Methods in Enzymol. 14, 329-381

ALFERMANN,A.W. (1973): Untersuchungen zur Anthocyansynthese in Kalluskulturen von Daucus carota L. Diss. Tübingen.

AVERY, OT., MacLEOD, C.M., und Mc CARTY, M. (1944): Studies on the chemicalnature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. J. Exp. Med. 79, 137-158

AWASTHI, Y.C., RUZIKA, F.J. und CRANE, F.L. (1970): The relation between phospholipase action and release of NADH dehydrogenase from mitochondrial membrane. Biochim. Biophys. Acta 203, 233-248

BAUR, E. (1909) : Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der "Varietas albomarginatae hort" von Pelargonium zonale. Z. Vererbungsl. 1, 330-351

BEN ABDELKADAR, A. und MAZLIAK, P. (1970): Echanges de lipides entre mitochondries,microsomes et surnageant cytoplasmique de cellules de pomme de terre ou de chou-fleur.Eur.J. Biochem. 15, 250-262

BONNER, W.D., Jr.(1967): A general method for the preparation of plant mitochondria. Methods in Enzymol. 10, 126-133

van den BOSCH,H.(1974):Phosphoglyceride metabolism. Ann.Rev.Biochem. 43, 243-277

BOSCHETTI, A. (1978) : Biogenese der Chloroplasten und Mitochondrien. G. Fischer, Stuttgart.

BRENNICKE,A. (1979): Untersuchungen der mitochondrialen DNA von Oenotheren bekannter genetischer Konstitution. Diss. Tübingen.

BRÜCK, H. (1979): Über die Eigenschaften der Adenosintriphosphat-Hydrolase der Mitochondrien bei einem Oenotheren-Bastard. Staatsexamensarbeit Tübingen.

BÜCHER, T., NEUPERT, W., SEBALD, W. und WERNER, S., eds. (1976): Genetics and biogenesis of chloroplasts and mitochondria. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam

CHANCE, B. und WILLIAMS, J.R. (1956): The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymol. 17, 65-134

CHRISTNER, H.J. (1973):Der Einfluss des Plasmotypus auf die Flavonoidsynthese. Diss. Tübingen.

CHUN, E.H.L., VAUGHAN, M.H. und RICH, A. (1963) :
The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations. J.Mol. Biol. 7, 130-141

CLELAND, R.E. (1972) :
Oenothera. Acad.Press London

CLAUSS, G. und EBNER, H. (1971) :
Grundlagen der Statistik. H. Deutsch, Frankfurt.

COBON, G.S., CROWFOOT, P.D. und LINNANE, A.W. (1974):
Biogenesis of mitochondria.Phosphlipid synthesis in vitro by yeast mitochondrial and microsomal fractions.Biochem. J. 144, 265-275

COBON, G.S.,CROWFOOT, P.D. und LINNANE, A.W. (1977):
Biogenesis of mitochondria. The effects of catabolite repression on the in vitro phospholipid synthetic capacities of subcellular fractions of respiratory-competent and respiratory-deficient stains of Saccharomyces cerevisiae. Arch. Biochem. Biophys. 181, 454-461

CORRENS, C. (1909) :
Vererbungslehre mit blass(gelb) grünen und buntblättrigen Sippen bei Mirabilis, Urtica und Lunaria. Z. Vererbungsl. 1, 291-329

CZIHAK, G., LANGER, H. und ZIEGLER, H., eds. (1978) :
Biologie. 2. Auflage. Springer, Berlin.

DANIELLI, J.F. und DAVSON, H.A. (1935):
A contribution to the theory of permeability of thin films. J.Cell. Comp. Physiol. 5, 495-508

DAY, D.A. und WISKICH, J.T. (1974):
The oxidation of malate and exogenous reduced nicotinamide adenine dinucleotide by isolated plant mitochondria. Plant Physiol. 53, 104-109

DAY, D.A. und WISKICH, J.T. (1975) :
Isolation and properties of the outer membrane of plant mitochondria. Arch. Biochem. Biophs. 171, 197-123

DIETRICH, W. (1977) :
The South American species of Oenothera sect. Oenothera (Raimannia, Renneria, Onagraceae). Ann. Mo.Bot. Gard. 64, 367-372

DIZENGREMEL, P. (1977) :
Increased participatio_ of the outer mitochondrial membrane in the oxidation of exogenous NADH during aging of potato slices. Plant Sci. Lett. 8, 283-289

DOGRAS, C.C., DILLEY, D.R. und HERNER, R.C. (1977):
Phospholipid biosynthesis and fatty acid content in relation to chilling injury during germination of seeds. Plant Physiol. 60, 897-903

DONALDSON, R.P. und BEEVERS, H. (1977):
Lipid composition of organelles from germinating castor bean endosperm. Plant Physiol. 59, 259-263

DOUCE, R., CHRISTENSEN, E.L. und BONNER, W.D. (1972):
Preparation of intact plant mitochondria. Biochim. Biophs. Acta 275, 148-160

DOUCE, R., GUILLOT-SALOMON, T., LANCE, C. und SIGNOL, M. (1968):
Etude comparée de la composition en phospholipides de mitochondries et de chloroplastes isolés de quelques tissus végétaux.
Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég. 14, 351-373

DOUCE, R., MANNELLA, C.A. und BONNER, W.D., Jr. (1972):
Site of biosynthesis of CDP-diglycerid in plant mitochondria. Biochem. Biophy. Res. Comm. 49, 1504-1509

DOUCE, R., MANNELLA, C.A. und BONNER, W.D., Jr. (1973):
The external NADH dehydrogenases of intact plant mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 292, 105-116

DOUCE, R., MOORE, A.L. und NEUBURGER, M. (1977):
Isolation and oxidative properties of intact mitochondria isolated from spinach leaves.Plant Physiol.60, 625-628

ERNSTER, L. und KUYLENSTIERNA, B. (1970):
Outer membrane of mitochondria. In: Membranes of mitochondria and chloroplastes (Racker, E., ed.), van Nostrand Reinhold Comp., New York, 172-212

ESTABROOK, R.W. (1967) :
Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. Methods in Enzymol. 10, 41-47

FREY, H.D. und SCHWEMMLE, B. (1967) :
Zur genetischen Analyse der circadianen Rhythmik bei höheren Planzen. Nachr. Akad.Wiss. Göttingen 10, 106-107

GARDESTROM, P., ERICSON, I. und LARSSON, C. (1978):
Preparation of mitochondria from the green leaves of spinach by differential centrifugation and phase partition. Plant Sci. Lett. 13, 231-329

GILLHAM, N.W. (1978) :
Organelle heredity. Raven Press, New York

GRONEBAUM-TURCK, K. und WILLENBRINK, J. (1971):
Isolierung und Eigenschaften von Mitochondrien aus Blättern von Spinacia oleracea und Beta vulgaris.
Planta 100, 337-346

HACHTEL, W. (1972) : Der Einfluss des Plasmotypus auf die Regulation der Aktivität der L- Phenylalanin- Ammonium-Lyase.(Untersuchungen an Raimannia-Oenotheren). Planta 102, 247-260

HACHTEL, W. und SCHWEMMLE, B. (1972) :
Zur Beteiligung des Plasmons an der Regulation der L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL). Z. Pflanzenphysiol. 68, 127-133

HAFETI, Y., GALANTE, Y.M., STIGGALL, D.L. und DJAVADI-OHANIANCE, L. (1976): Recent advances on the chemistry of the mitochondrial oxidative phosphorylation system.In: The structural basis of membrane function (Hafeti,Y. und Djavadi-Ohaniance, L., eds.) Acad.Press. New York, 169-188

HAGEMANN, R. (1964): Plasmatische Vererbung. G. Fischer, Jena

HALL, J.L., FLOWERS, T.J. und ROBERTS, R.M. (1974):
Plant cell structure and metabolism. Longman, London, 232-268

HARMON, H.J., HALL, J.D. und CRANE, F.L. (1974):
Structure of mitochondrial cristae membranes. Biochim. Biophys. Acta 344, 119-155

HARRISON, R. und LUNT, G.G. (1977) :
Biologische Membranen. G. Fischer, Stuttgart

HEIL, A. und ZILLIG, W. (1970) :
Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcripition. FEBS Lett. 11, 165-168

HELDT, H.W. (1976) : Transport of metabolites between cytoplasm and the mitochondrial matrix. In: Transport in plants III. Intracellular interactions and transport processes (Stocking, C.R. und Heber, U., eds.) Springer, Berlin, 235-254

HINKLE, PC. und McCARTY, R.E. (1978) :
How cells make ATP, Sci. Am. 238, 104-123

HIRNINGER, E. (1979): Versuche zur Charakterisierung eines Enzyms (ATPase) aus den Mitochondrien des odorata-Typs eines genetisch bekannten Oenotheren-Bastards. Staatsexamensarbeit Tübingen.

IKUMA, H. (1972) : Electron transport in plant respiration. Ann. Rev. Plant Physiol. 23, 419-436

JARVIS, M.C. und DUNCAN, H.J. (1974) :
Distribution of glycolipids and phospholipids in Pteridium aquilinum. Phytochem. 13, 979-981

JINKS, J.L. (1967) : Extrachromosomale Vererbung. G. Fischer, Stuttgart

KAISER, P. (1973) : Chromatographie in der Gasphase.Bibl.Inst., Mannheim

KALRA, S.K. und BROOKS, J.L. (1973) : Lipids of ripening tomato fruit and its mitochondrial fraction. Phytochem. 12, 487-492

KANE,O. MARCELLIN, P. und MAZLIAK, P. (1978): Incidence of ripening and chilling injury on the oxidative activities and fatty acid compositions on the mitochondria from mango fruits.Plant Physiol. 61, 634-638

KARLSON, P. (1977) : Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. G. Thieme, Stuttgart.

KATES, M. (1975) : Techniques of lipidologie. Isolation, analysis and identification of lipids. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam.

LATIES, G.G. (1974): Isolation of mitochondria from plant material. Methods in Enzymol. 31, 589-600

LINNANE, A.W., HASLAM, J.M., LUKINS, H.B. und NAGLEY, P. (1973): The biogenesis of mitochondria in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 26, 163-198

LEHNINGER A.L. (1964). The mitochondrion : Molecular basis of structure and function. W.A. Benjamin Inc., New York.

LODISH, H.F. und ROTHMAN, J.E. (1979): Die Bildung von Zellmembranen, Spektrum d. Wiss. 2 (3), 30-47

LUCK, D.J.L. (1963): Formation of mitochondria in Neurospora crassa. A quantitative radioautographic study.J.Cell Biol. 16, 483-499

LUCK, D.J.L. und REICH, E. (1964) : DNA in mitochondia of Neurospora crassa.Proc. Natl. Acad. Sci. 52, 931-938

MANNELIA, C.A. und BONNER, W.D., Jr. (1975) : Biochemical characteristics of the outer membranes of plant mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 413, 213-225

MAUTE, G. (1978) : Untersuchungen über die Atmungsaktivität von Mitochondrien bei zwei bekannten Oenotheren-Arten. Staatsexamensarbeit Tübingen.

McCARTY, R.E., DOUCE, R. und BENSON, A.A. (1973) : The acyl lipidis of highly purified plant mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 316, 266-270

MICHAELIS, P. (1962) : Über Zahlengesetzmässigkeiten plasmatischer Erbträger, insbesondere der Plastiden (Sammelreferat). Protoplasma 55, 177-231

MICHAELIS, G. (1976) : Extrakaryotic inheritance.Progr.Bot. 38, 205-217

MITCHELL, P. (1961) : Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature 191, 144-148

MITCHELL, P. (1968) : Chemiosmotic coupling and energy transduction. Glynn Research Bodmin. Cornwall

MOREAU, F. und LANCE, C. (1972) : Isolement et propriétés des membranes externes et internes de mitochondries végétales. Biochimie 54, 1335-1348

MOREAU, F., DUPONT, J. und LANCE, C. (1974) : Phospholipid and fatty acid composition of outer and inner membranes of plant mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 345, 294-304

MÜLLER, M. und SANTARIUS, K.A. (1978) : Changes in chloroplast membrane lipids during adaptation of barley to extreme salinity. Plant Physiol. 62, 326-329

NAKAMURA, K. und ASAHI, T. (1976) : Changes in properties of the inner mitochondrial membrane during mitochondrial biogenesis in aging sweet potato tissue slices in relation to the development of cyanid-insensitive respiration. Arch. Biochem. Biophys. 174, 393-401

NITSCH, J.P. und NITSCH, C. (1969) : Haploid plants from pollen grains. Science 163, 85-87

OTTMAR, C. (1979) : Untersuchungen über die spezifische Aktivität von Mitochondrienenzymen bei zwei genetisch bekannten Oenotheren-Formen. Staatsexamensarbeit Tübingen.

OVERATH, P., SCHAIRER, H.U. und STOFFEL, W. (1970) : Correlaton of in vivo and in vitro phase transitions of membrane lipids in Eschericia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. 67, 606-612

OVERATH, P. und TRÄUBLE, H. (1973) : Phase transitions in cells, membranes, and lipids of Eschericia coli. Biochemistry 12, 2625-2634

PALMER, J.M. (1976) : The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. Ann. Rev.Plant Physiol. 27, 133-157

PERTOFT, H. (1969) : The separation of rat liver cells in colloidal silica-polyethylene glycol gradients. Exp. Cell Res. 57, 338-350

PFLUMM,M. (1979) : Über den Einfluss des Antibiotikums Rotenon auf die Atmung von Mitochondrien. Staatsexamensarbeit Tübingen

POHL, P., GLASL, H. und WAGNER, H. (1970) : Zur Analytik pflanzlicher Glyko- und Phospholipoide und ihrer Fettsäuren. J. Chromatogr. 49, 488-492

RENNER, O. (1934): Die pflanzlichen Plastiden als selbständige Elemente der genetischen Konstitution. Ber. Verh.sächs. Akad. Wiss. Leipzig. Math.-phys. Kl. 86, 241-266

RICKWOOD, D.(1978):Isopycnic centrifugation in nonionic media.In: Centrifugal separation in molecular and cell biology. (Birnie, G.D. und Richwood, D., eds.) Butterworth, London, 219-250

SAGER, R. (1972): Cytoplasmic genes and organelles. Acad.Press, New York

SAGER, R. und ISHIDA, M.R. (1963) : Chloroplast DNA in Clamydomonas. Proc. Natl.Acad. Sci. 50, 725-730

SCHATZ, G. (1976): The biogenesis of mitochondria. In: Genetics, biogenesis, and bioenergetics of mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Thomas, D.Y., Wolf,K. und Kaudewitz, F., eds.) de Gruyter, Berlin, 163-177

SCHATZ, G. und MAISON, T.L. (1974) : The biosynthesis of mitochondrial proteins. Ann. Rev. Biochem. 43, 51-87

SCHMITT, J.M. und HERRMANN, R.G. (1977): Fractionation of cell organelles in silica sol gradients. Methods in Cell Biol. 15, 177-200

SCHWARTZ, R. M. und DAYHOFF, M.O. (1978) : Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. Science 199, 395-403

SCHWEMMLE, B. (1962) : Über den Einfluss von Kern, Plasma und Plastiden auf die photoperiodische Reaktion einiger Raimannia-Oenotheren. Planta 58, 619-646

SCHWEMMLE, J., HAUSTEIN, E., STURM, A. und BINDER, M. (1938) : Genetische und zytologische Untersuchungen an Eu-Oenotheren. Z. Vererbungsl. 75, 358-800

SCHWEMMLER, W. (1977) : Die Zelle: Elementarorganismus oder Endosymbiose. Biol. unserer Zeit 7, 7-14

SCHWERTNER, H.A. und BIALE, J.B. (1973): Lipid composition of plant mitochondria and of chloroplasts. J. Lipid Res. 14, 235-242

SINGER, S.J. und NICOLSON, G.L. (1972):
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175, 720-731

SMITH, H., ed. (1977) :
The molecular biology of plant cells. Blackwell, Oxford, 105-135

SMITH, H., ed. (1977) :
The molecular biology of plant cells. Blackwell, Oxford, 280-305

SOLOMOS, T. (1977):Cyanid-resistant respiration in higher plants. Ann.Rev. Plant Physiol. 28, 279-297

TEDESCHI, H. (1976):Mitochondria: Structure, biogenesis and transducing functions. Springer, Wien

THEOLOGIS, A. und LATIES, G.G. (1978) :
Antimycin-insesitive cytochrome mediated respiration in fresh and aged potato slices. Plant Physiol. 62, 238-242

THEOLOGIS, A. und LATIES, G.G. (1978) :
Cyanid-resistant respiration in fresh and aged sweet potato slices. Plant Physiol. 62, 243-248

TZAGOLOFF, A., RUBIN, M.S. und SIERRA, M.F. (1973) :
Biosynthesis of mitochondrial enzymes. Biochim, Biophys. Acta 301, 71-104

VASKOVSKY, V.E., KOSTETSKY, E.Y. und VASENDIN, I.M. (1975) :
A universal ragent for phospholipid analysis. J.Chromatogr. 114, 129-141

WARING, A.J., BREIDENBACH, R.W. und LYONS, J.M. (1976) :
In vivo modification of plant membrane phospholipid composition. Biochim. Biophys.Acta 433. 157-168

WIRTZ, K.W.A., LUMB, R.H., KAMP, H.H., HELMKAMP, G.M., van den BOSCH,H. und van DEENEN, L.L.M. (1976) :
Mitochondrial phospholipid synthesis and the phospholipid exchange proteins. In: Genetics and biogenesis of chloroplasts and mitochondria (Bücher, T.,Neupert,W. Sebald,W.und Werner, S., eds.). North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, 785-792

van WISSELINGH, C. (1920) :
Über Variabilität und Erblichkeit. Z. Vererbungsl. 22, 65-89

ZELITCH, J. (1967):Mitochondria from spinach leaves. Methods in Enzymol. 10, 133-135

Lebenslauf

Benz, Reiner, geboren am 13.Oktober 1948 in Giengen an der Brenz als Sohn des Kaufmanns Ernst Benz und seiner Frau Elisabeth Benz, geb. Niedan

1956 - 1960	Volksschule Giengen
1960 - 1969	Gymnasium Giengen
4.6.1969	Reifeprüfung
WS 1969/70 - SS 1970	Studium der Mathematik und Geographie in Erlangen
WS 1970/71 - SS 1975	Studium der Biologie und Geographie in Tübingen
WS 1973/74	Anfertigung einer Zulassungsarbeit bei Herrn Prof. Dr. Wilhelmy über das Thema: "Das Trockengebiet in Nordostbrasilien. Klimatische Grundlagen und wirtschaftliche Möglichkeiten."
Juni 1974	Staatsexamen in Geographie
Mai 1975	Staatsexamen in Biologie
SS 1976 - SS 1979	Arbeit an der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. B.Schwemmle

In der Zeit vom 1.5.1976 bis 31.10.1978 erhielt ich ein Promotionsstipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz.

Im WS 1978/79 war ich wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Biologie I der Universität Tübingen und vom Mai 1979 - August 1979 wissenschaftlicher Redakteur für Biologie beim Ernst-Klett-Verlag in Stuttgart.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren

Ammermann, Beermann, Bentrup, Blume, Braun, Bünning, Flohé, Grell, Hager, Henning, Karger, Kulzer, Mägdefrau, Metzner, Möhres, Neuweiler, Nöbeling, Overath, Rüdorff, Schönenberg, Schröder, Schwartz, Schwemmle, Seiler, Westphal, Wilhelmy, Winkler, Wirth, Zähner, Zetsche

Herrn Prof.Dr. B. Schwemmle danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, sein ständiges Interesse und für seine Ratschläge bei der Durchführung der Versuche.

Ebenso gilt mein Dank Frau U.Christner für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor.